

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y**  
**Biotechnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica**



**“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL CONSORCIO  
MICROBIANO CON POTENCIAL DEGRADATIVO DE CROMO”**

Tesis presentada por el bachiller:

**Cáceres Silva, Gabriela Valery**

Para optar el Título Profesional de:

**Ingeniero Biotechnológico**

Asesor:

Dr. Jiménez Pacheco, Hugo Guillermo

**Arequipa – Perú**  
**2019**



Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

N° Trámite en Fac. 434-2019  
Fecha Recep. Fac. 25-06-2019

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

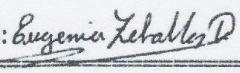
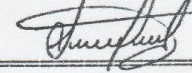
DE: **CACERES SILVA, Gabriela Valery**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**"AISLAMIENTO, CARACTERIZACION E IDENTIFICACION DEL CONSORCIO MICROBIANO CON POTENCIAL DEGRADATIVO DE CROMO A PARTIR DE EFLUENTES DE CURTIEMBRE"**

DICTAMINADORES: **Ing. Eugenia Zeballos Delgado 2) Mgter. Shanery Marcilla Truyenque**

**DICTAMEN DE PLAN:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"AISLAMIENTO, CARACTERIZACION E IDENTIFICACION DEL CONSORCIO MICROBIANO CON POTENCIAL DEGRADATIVO DE CROMO A PARTIR DE EFLUENTES DE CURTIEMBRE"**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.  
Atentamente

FIRMAS:   FECHA 10/07/2019

ASESOR: **Dr. Hugo Jiménez Pacheco**

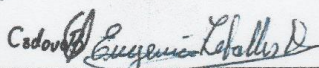
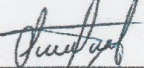
**DICTAMEN ASESORÍA:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.  
Atentamente

FIRMA  FECHA 12/07/2019

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Ing. Cinthia Córdova Barrios**
- 2) **Ing. Eugenia Zeballos Delgado**
- 3) **Mgter. Shanery Marcilla Truyenque**

**DICTAMEN FINAL:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: **"AISLAMIENTO, CARACTERIZACION E IDENTIFICACION DEL CONSORCIO MICROBIANO CON POTENCIAL DEGRADATIVO DE CROMO"** y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.  
Atentamente

FIRMA   FECHA 18/07/2019

JURADOS: PRESIDENTE **ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS**  
VOCAL **ING. EUGENIA ZEBALLOS DELGADO**  
SECRETARIO **MAG. SHANERY MARCILLA TRUYENQUE**

FECHA 19/8/19 HORA 19.00 LOCAL C-402

FIRMA DEL DECANO 

FECHA



## DEDICATORIA

*A Dios, por guiarme y no dejar que pierda de vista mis sueños y metas.*

*A mi familia, que siempre están en cada paso que doy, apoyándome incondicionalmente.*

*A toffy que me hizo una persona más fuerte, y me enseñó muchas cosas. Ahora, gracias toffy por ser mi compañera incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia que me apoya en todos mis proyectos, siendo mis principales motores para realizar cada sueño. Gracias a ellos por confiar y creer en mí.

A Ingemar que me apoyó en todo momento, y darme muchos motivos para esforzarme cada día, gracias por nunca dejar de creer en mí.

Al grupo de investigación “Innovergy” por darme la gran oportunidad de participar en este proyecto.

A todas las personas que me ayudaron a realizar este gran trabajo, y ayudar que se haga realidad.

## INDICE DE CONTENIDO

|   |      |
|---|------|
| DEDICATORIA .....   | iv   |
| AGRADECIMIENTOS .....   | iii  |
| RESUMEN .....   | x    |
| ABSTRACT.....   | xi   |
| INTRODUCCIÓN .....  | xii  |
| OBJETIVOS .....   | xiii |
| HIPOTESIS.....  | xiv  |
| CAPÍTULO I .....  | 1    |
| MARCO TEÓRICO .....   | 1    |
| CAPITULO II.....  | 17   |
| MATERIALES Y METODOS.....   | 17   |
| 2.1. MATERIALES .....   | 17   |
| 2.1.1. MUESTRAS Y/O UNIDADES BIOLÓGICAS:.....   | 17   |
| 2.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO .....  | 17   |
| 2.1.2.1. MATERIAL DE VIDRIO .....   | 17   |
| 2.1.3. INSUMOS Y REACTIVOS QUÍMICOS.....  | 18   |
| 2.1.4. EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN .....  | 19   |
| 2.1.5. OTROS.....   | 19   |
| 2.1.6. SOFTWARE .....   | 19   |
| 2.2. MÉTODOS .....  | 20   |
| 2.2.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN CONSORCIO<br>MICROBIANO A PARTIR DE UN EFLUENTE DE INDUSTRIA CURTIEMBRE.<br>20     |      |
| 2.2.1.1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA .....  | 20   |
| 2.2.1.2. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN<br>MICROBIOLÓGICA Y BIOQUÍMICAMENTE DE UN CONSORCIO<br>MICROBIANO..... | 20   |
| 2.2.1.3. CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL<br>CONSORCIO MICROBIANO.....   | 22   |
| 2.2.1.4. CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL<br>CONSORCIO MICROBIANO.....   | 22   |
| 2.2.2. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS MICROORGANISMOS....   | 23   |
| 2.2.2.1. PRUEBA DE TSI (TRIPLE SUGAR IRON). .....   | 23   |



|  |    |
|--|----|
| 2.2.2.2. PRUEBA DE LIA (AGAR LISINA HIERRO).....   | 23 |
| 2.2.2.3. PRUEBA DE SIM (SULFURO INDOL MOTILIDAD).....  | 24 |
| 2.2.2.4. PRUEBA DE UREASA.....   | 24 |
| 2.2.2.5. PRUEBA DE CITRATO DE SIMMONS .....  | 24 |
| 2.2.2.6. KIA (KLIGLER IRON AGAR).....  | 25 |
| 2.2.2.7. OF (OXIDACION - FERMENTACIÓN).....  | 25 |
| 2.2.2.8. MRVP (ROJO DE METILO/VOGES PROSKAUER) .....   | 26 |
| 2.2.3. EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA BACTERIANA.....   | 26 |
| 2.2.3.1. CURVA DE CRECIMIENTO .....  | 26 |
| 2.2.3.2. CINÉTICA MICROBIANA .....   | 27 |
| 2.2.4. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS FRENTE A<br>DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CROMO.....                     | 28 |
| 2.2.5. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADATIVA DE CROMO<br>POR EFECTO DEL CONSORCIO MICROBIANO .....                    | 29 |
| CAPITULO III:.....   | 30 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 30 |
| 3.1. Aislamiento y caracterización del consorcio microbiano obtenido de una<br>muestra de efluente de curtiembre ..... | 30 |
| 3.2. Caracterización microbiológica de las bacterias.....  | 32 |
| 3.2.1. Caracterización bioquímica de las bacterias. ....   | 32 |
| 3.3. Susceptibilidad de las bacterias a diferentes concentraciones de cromo. ...                                       | 34 |
| 3.4. Cinética microbiana de las bacterias aisladas. ....   | 35 |
| 3.4.1. Curva de calibración de McFarland .....   | 35 |
| 3.4.2. Crecimiento microbiano.....   | 36 |
| 3.5. Determinación de la capacidad degradativa de cromo de las bacterias. ....   | 43 |
| 3.5.1. Curva de calibración de cromo.....  | 44 |
| 3.5.2. Determinación de degradación de cromo (VI) de las bacterias .....   | 45 |
| CAPITULO IV.....   | 51 |
| CONCLUSIONES.....  | 51 |
| RECOMENDACIONES .....  | 53 |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 54 |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Fig. 2.1 Curtiembre del PIRS.....   | 20 |
| Fig. 2.2 Modo de siembra por agotamiento.....   | 22 |
| Fig. 3.1 Colonias formadas a partir de efluente de curtiembre.....  | 30 |
| Fig. 3.2 Cepas aisladas resistentes a cromo.....  | 31 |
| Fig. 3.3 Tinción Gram de bacterias seleccionadas A, B, C, D y E.....                                      | 32 |
| Fig. 3.4 Placas de susceptibilidad de las cepas A, B, C, D y E a diferentes concentraciones de cromo..... | 34 |
| Fig. 3.5 Curva de calibración de McFarland.....   | 35 |
| Fig 3.6 Curva de crecimiento bacteriano de la cepa A.....   | 36 |
| Fig 3.7 Curva de crecimiento bacteriano de la cepa B.....   | 37 |
| Fig. 3.8 Curva de crecimiento bacteriano de la cepa C.....  | 37 |
| Fig. 3.9 Curva de crecimiento bacteriano de la cepa D.....  | 38 |
| Fig. 3.10 Curva de crecimiento bacteriano de la cepa E.....   | 39 |
| Fig. 3.11 Cinética de crecimiento bacteriano de la cepa A.....  | 40 |
| Fig. 3.12 Cinética de crecimiento bacteriano de la cepa B.....  | 40 |
| Fig. 3.13 Cinética de crecimiento bacteriano de la cepa C.....  | 41 |
| Fig. 3.14 Cinética de crecimiento bacteriano de la cepa D.....  | 41 |
| Fig. 3.15 Cinética de crecimiento bacteriano de la cepa E.....  | 42 |
| Fig. 3.16 Primer día de inóculo de las bacterias con cromo.....   | 43 |
| Fig. 3.17 Día 10 del inóculo de las bacterias con cromo.....  | 44 |
| Fig. 3.18 Curva de calibración del cromo.....   | 44 |
| Fig. 3.19 Disminución de remoción de cromo de la cepa A.....  | 45 |
| Fig. 3.20 Curva de degradación de cromo de la cepa B.....   | 46 |
| Fig. 3.21 Curva de degradación de cromo de la cepa C.....   | 47 |
| Fig. 3.22 Curva de degradación de cromo de la cepa D.....   | 48 |
| Fig. 3.23 Curva de degradación de cromo de la cepa E.....   | 49 |
| Fig. 3.24 Comparación de la capacidad de degradación de las 5 cepas.....                                  | 50 |

## INDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1: Valores Máximos Admisibles.....  | 08 |
| Tabla 2: Valores Máximos Admisibles.....  | 09 |
| Tabla 3. Tabla de medidas para la escala McFarland.....                                 | 27 |
| Tabla 4. Resultado de pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias seleccionadas..... | 33 |





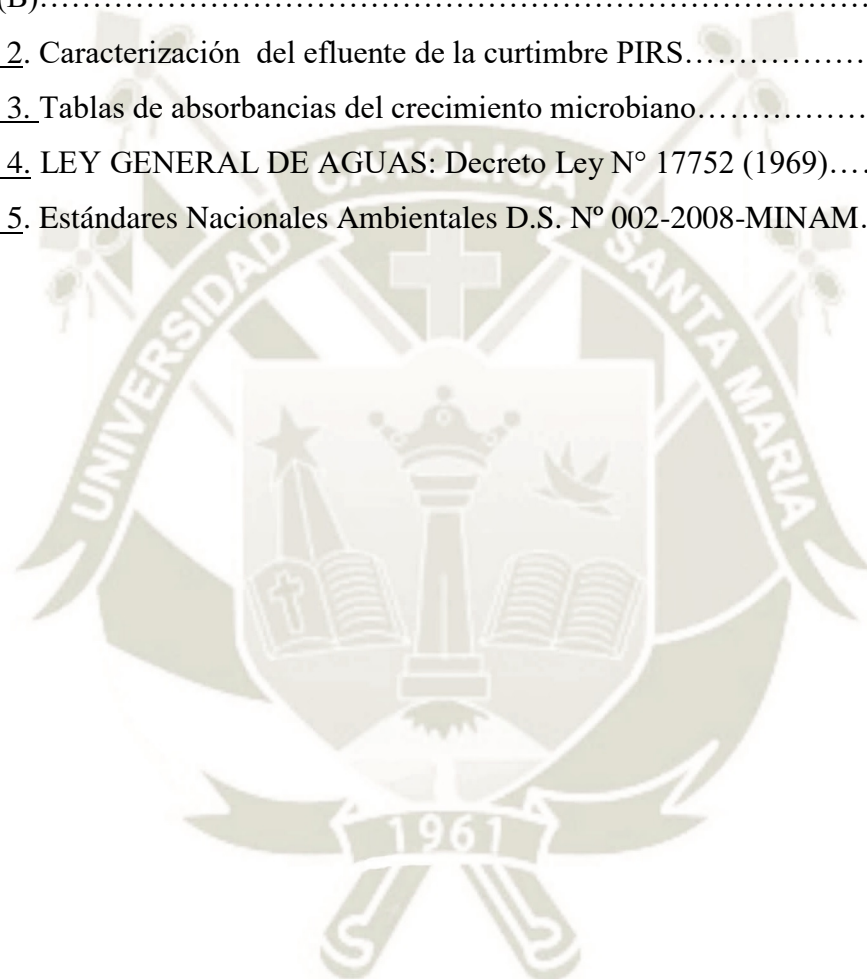
## INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación de porcentaje de remoción..... 45



## INDICE DE ANEXOS

|  |    |
|--|----|
| <u>Anexo 1.</u> Composición del Medio Luria Bertani (A) y medio LB contaminado con cromo(B)..... | 58 |
| <u>Anexo 2.</u> Caracterización del efluente de la curtiembre PIRS.....                          | 59 |
| <u>Anexo 3.</u> Tablas de absorbancias del crecimiento microbiano.....                           | 60 |
| <u>Anexo 4.</u> LEY GENERAL DE AGUAS: Decreto Ley N° 17752 (1969).....                           | 63 |
| <u>Anexo 5.</u> Estándares Nacionales Ambientales D.S. N° 002-2008-MINAM.....                    | 64 |



## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se aisló, caracterizó e identificó microorganismos a partir de los efluentes de curtiembre del Parque Industrial de Río Seco ubicado en el distrito de Cerro Colorado, en la ciudad de Arequipa, con capacidad de resistencia a concentraciones elevadas de cromo (VI) y poder evaluar la capacidad degradativa de las bacterias frente a este metal. Bajo este criterio, primero se tomaron muestras del efluente de la curtiembre del PIRS (Parque Industrial de Río Seco). Para determinar sólo presencia de bacterias, se utilizó el medio de cultivo LB, posteriormente para seleccionar las cepas que resisten a concentraciones altas de cromo, se cultivaron todas las colonias en el mismo medio añadiendo 500 mg/L de Dicromato de potasio, donde se aislaron 5 cepas diferentes. Posteriormente, se procedió a la identificación morfológica y bioquímica de cada cepa, encontrando las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxycata*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*. Luego, se determinó la susceptibilidad de las bacterias ante diferentes concentraciones de cromo; determinando que la concentración a cual resistieron estas bacterias fue a 500 mg/L, se realizó por el método de Kirby Bauer modificado. Finalmente, se evaluó el crecimiento microbiano de estas cepas durante 24 horas y se hizo la selección de cepas con mejor capacidad degradativa de cromo. La degradación de cromo se realizó por un periodo de 10 días, determinando que todas las bacterias fueron resistentes a concentraciones elevadas de cromo (VI) sin embargo no todas lo degradaron de la misma manera: la bacteria C (*Klebsiella oxycata*) degradó un 92 % de cromo (VI), la bacteria A (*Bacillus subtilis*) degradó un 74 % de cromo (VI) y la bacteria D (*Escherichia coli*) que degradó un 63 % de cromo (VI), la bacteria B (*Enterobacter cloacae*) degradó sólo un 37 % y la bacteria D (*Pseudomona aeruginosa*) degradó sólo un 22 % de cromo (VI).

**PALABRAS CLAVE:** *cromo, curtiembre, bacterias, efluente*



## ABSTRACT

In the present investigation work, microorganisms were isolated, characterized and identified from the tannery effluents of the Industrial Park of Río Seco located in the district of Cerro Colorado, in the city of Arequipa, with capacity to resist high concentrations of chromium (VI) and be able to assess the degradative capacity of bacteria against this metal. Under this criterion, samples were first taken of the effluent from the tannery of the PIRS (Industrial Park of Río Seco). To determine only the presence of bacteria, the LB culture medium was used, subsequently to select the strains that resist high concentrations of chromium, all colonies were grown in the same medium by adding 500 mg / L of potassium dichromate, where they were isolated 5 different strains. Subsequently, the morphological and biochemical identification of each strain was performed, finding the following bacteria: *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxycata*, *Pseudomona aeruginosa* and *Escherichia coli*. Then, the susceptibility of the bacteria to different concentrations of chromium was determined; determining that the concentration at which these bacteria resisted was 500 mg / L, was performed by the modified Kirby Bauer method. Finally, the microbial growth of these strains was evaluated for 24 hours and the selection of strains with better chromium degradation capacity was made. Chromium degradation was performed for a period of 10 days, determining that all bacteria were resistant to high concentrations of chromium (VI), however, not all degraded in the same way: bacteria C (*Klebsiella oxycata*) degraded 92% of chromium (VI), bacteria A (*Bacillus subtilis*) degraded 74% chromium (VI) and bacteria D (*Escherichia coli*) that degraded 63% chromium (VI), bacteria B (*Enterobacter cloacae*) degraded only 37% and bacteria D (*Pseudomona aeruginosa*) degraded only 22% chromium (VI).

**KEYWORDS:** *chrome, tannery, bacteria, effluent*

## INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, se ha podido observar, el gran incremento de industrias, sobre todo las curtiembres, lo que ha producido el uso desenfrenado de sustancias químicas como el cromo. Dichas sustancias tóxicas usualmente son vertidas sobre el agua y la superficie terrestre sin tratamiento alguno, generando uno de los mayores problemas que afronta nuestro país actualmente, deteriorando constantemente nuestro medio ambiente. Los vertimientos industriales contienen una gran variedad de contaminantes, principalmente los metales pesados, siendo el tema que merece específica atención, ya que estos metales a determinadas concentraciones suelen ser muy tóxicos para el ser humano. (1)

Tal es el caso del cromo, el cual es considerado como uno de los principales contaminantes, según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés), por su gran uso en distintas actividades industriales. Dentro de estas industrias se encuentran: teñido de textiles la metalúrgica, galvanoplastia, acabado de metales, curtiembres y fertilizantes, entre otras. (2)

Lamentablemente, en nuestra ciudad el tratamiento de efluentes de curtiembres es casi nulo, ya que su tratamiento es de alto costo, estos efluentes simplemente son desechados por los alcantarillados, exponiendo a la población y poniéndola en contacto con estos efluentes; es así como la gente puede contaminarse y adquirir diversas patologías como principalmente el cáncer, daños al sistema inmune, problemas respiratorios, defectos de nacimiento, problemas en el sistema nervioso. (3)

Ya que los tratamientos convencionales para efluentes son de difícil acceso, se busca emplear métodos innovadores y al alcance de todos, como el uso de la biotecnología. Los microorganismos son expuestos a metales pesados desde hace muchos años, es por eso que se considera a la biotecnología como una opción sobre los procesos convencionales para el tratamiento de efluentes con presencia de metales. Es habitual que, al encontrarse en ambientes contaminados con metales pesados como el cromo, las bacterias muestren una adaptación evolutiva, esto quiere decir, que tienen la capacidad de sobrevivir en presencia de estos metales; dada la gran diversidad de mecanismos genéticos de resistencia. Es por esto que se asume de manera general que son bacterias resistentes a cromo. (4)

Por lo que en el presente trabajo de investigación se aislarán e identificarán bacterias de un efluente de industria curtiembre, determinando su susceptibilidad ante este metal y evaluando el poder degradativo de cromo (VI) de dichas bacterias.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Aislar, caracterizar e identificar el consorcio microbiano con potencial degradativo de cromo (VI).

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar, caracterizar e identificar un consorcio microbiano a partir de efluentes de curtiembre.
2. Determinar la susceptibilidad de las bacterias a diferentes concentraciones de cromo (VI).
3. Evaluar la capacidad de degradación de cromo (VI) por efecto del consorcio microbiano.



## HIPOTESIS

Debido a que existe evidencia de bacterias que resisten altas concentraciones de metales pesados, es posible aislar microorganismos a partir de efluentes de la industria curtiembre con capacidad degradativa de cromo (VI).



## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1. INDUSTRIA CURTIEMBRE

##### 1.1.1. PRINCIPALES FUNCIONES DE LA INDUSTRIA CURTIEMBRE

Las curtiembres son aquellos lugares en los que se convierten, mediante actividades industriales, la piel animal en cuero. En Arequipa, se ubica una industria curtiembre en el Parque Industrial de Río Seco (PIRS), en el distrito de Cerro Colorado. Este tipo de manufacturas emplean tres etapas en su proceso de producción: ribera, curtido y acabado. Es en estas etapas en las que se originan distintos tipos y cantidades de contaminantes. Si bien es cierto que existe un marco legal que exige un manejo ambiental, esto no se cumple y se deja de lado debido a la falta de control. Este proceso de transformación también tiene como una de sus principales características un elevado consumo de agua lo que genera que los efluentes originados en cada actividad contienen altas concentraciones de cromo.(5)

#### 1.2. CROMO

##### 1.2.1. USO DEL CROMO EN CURTIEMBRES

Al día de hoy, alrededor del 85 % del cuero en el mundo se trata a través de un proceso llamado curtido al cromo. Dicho procedimiento emplea una combinación de químicos, ácidos y sales. Este proceso es bastante veloz y tarda un día producir un trozo de cuero, en este caso ya curtido. Lo que se realiza en primer lugar es eliminar el pelo, luego se procede con el piquelado, dejarlo en la mezcla de sal y ácidos, para después colocarlo en el sulfato de cromo.(6)

Las curtiembres del Parque Industrial de Río Seco (PIRS) en Arequipa, utilizan una gran cantidad de sales de cromo y sulfuros, lo que ha causado

que se considere una de las actividades de manufactura más contaminantes del sector, generando así residuos líquidos con elevadas concentraciones de cromo, que sin tratamiento alguno, derivan a un estancamiento de aguas residuales, contaminando así el agua que parte de la población de la zona utiliza para sus sembríos y para su consumo sin previo tratamiento. (7)

### 1.2.2. CONTAMINACIÓN DE CROMO EN EL AMBIENTE

Uno de los elementos que podemos encontrar de forma natural tanto en plantas y suelos, es el cromo. Este elemento junto a sus compuestos es aplicado en diversos procesos industriales entre los cuales destacan el curtido, aleaciones, catalizadores, entre otros. Las aguas residuales derivadas de estos procedimientos están altamente contaminadas con este metal, lo que conlleva un importante riesgo tanto para el medio ambiente como para la salud del ser humano.

La toxicidad de dichas aguas residuales depende del estado de oxidación y concentración en que se encuentra, siendo de especial importancia la presencia de cromo hexavalente, ya que ha sido comprobado su carácter cancerígeno. (8)

## 1.3. CONTAMINACIÓN E IMPACTO AMBIENTAL DE CURTIEMBRES

### 1.3.1. EFLUENTES

Los efluentes o las también llamadas aguas residuales, son un producto causado por la contaminación del agua proveniente de diversos procesos industriales, llegando así a una determinada población ya sea para su consumo o uso agrícola. Al estar el agua contaminada, tanto las personas como cualquier ser vivo que llegue a consumirla perjudicarán a su salud y correrá el riesgo que afectar su día a día en un desarrollo normal. (9)



Una de las principales causas de la contaminación ambiental es la aparición de efluentes altamente tóxicos que provienen de diversas industrias, sobre todo, de aquellas que se dedican a la producción y procesamiento de pieles. Estas aguas residuales contienen básicamente cromo, sulfatos sulfuros y una gran cantidad de materia orgánica animal en su composición. (5)

La industria curtiembre a lo largo de su historia ha originado una gran contaminación del medio ambiente ya sea en el agua, suelo y en el aire del cual respiramos. Tanto las aguas desechadas por esta industria, como los gases contaminantes, tienen una alta y compleja mezcla de elementos contaminantes orgánicos e inorgánicos.

Una característica resaltante de la contaminación ambiental e impacto de las industrias curtiembre es la gran cantidad de agua que utiliza en sus procesos. Como consecuencia de esto, los desechos no son solo alarmantes por su volumen, sino porque llevan consigo una carga contaminante bastante importante. (10)

### 1.3.2. CONTAMINACIÓN DE SUELOS Y AGUAS

Actualmente, gran parte de los procesos industriales de empresas de diversos rubros son los causantes del alto grado de contaminación de muchas fuentes del recurso más importante para la vida, el agua. Dichas empresas se caracterizan por eliminar desechos con contaminantes inorgánicos, entre los que destacan los iones metálicos. (11)

Uno de los contaminantes más importantes en aguas son los metales cuando se encuentran disueltos. Tanto el plomo, cromo, cobre, entre otros se consideran como los más dañinos para el ser humano y otros seres vivos. Dichos metales son altamente estudiados, no solo por ser altamente tóxicos sino también debido a su predisposición por la bioacumulación y su resistencia en diversos medios por lo que no pueden ser degradados de

manera natural. La respuesta al porqué estos metales se encuentran en tal cantidad en el ambiente es debido a su gran concentración en los efluentes de las curtiembres y otras industrias con procesos contaminantes fuera de los límites permitidos por la normativa a nivel mundial. Esta desobediencia de las normas trae consecuencias negativas tanto a la salud humana como al ecosistema en general.

Un efluente con tratamiento puede llegar a beneficiar las actividades agrícolas, sin embargo, este tiene que ser controlado de la manera más eficiente posible para así prevenir daños en la configuración del suelo y caída de la producción en actividades de agricultura. (12)

Cuando existe una contaminación de las corrientes naturales de agua, los valores para determinados usos como el consumo humano y el riego en agricultura disminuyen, ya que afectan el normal desenvolvimiento de sus factores causando problemas de salud y perjudicando la productividad agrícola. Por otro lado las aguas bajo tierra tienen un problema más complejo, ya que su degradación o eliminación es lenta, lo cual causa la salinidad en estas aguas debido a una gran conglomeración de cloruros.

A lo largo de la historia de la humanidad se han registrado eventos de contaminación ambiental que han quedado marcadas en la mente de los ambientalistas. Bastante recordada es la catástrofe de Minamata en Japón causada por contaminación con metilmercurio. El consumo de pescados y mariscos (en los alrededores de una planta química) provocaron envenenamiento por Hg. Se pudo observar algunos síntomas como disturbios sensoriales, ataxia, disartria, constricción del campo visual y temblores, además se lograron identificar oficialmente 2252 afectados y 1043 fallecidos. (13)

### 1.3.3. EFECTOS EN LA BIODIVERSIDAD

La industria curtiembre es una de las más que más se caracteriza por expedir olores desagradables. Son muchos los químicos que se generan en sus procesos industriales entre los cuales resaltan el sulfuro de hidrógeno, cuyo origen está en los propios efluentes. También, por la degradación anaeróbica de dichos efluentes, podemos encontrarlos en los tanques de sedimentación. Aparte de esto, existen emisiones de gases como el amoníaco y los vapores de solventes, que no solamente originan un olor desagradable sino que también son sustancias peligrosas para la salud humana y perjudica el desarrollo normal de otros seres vivos.

El impacto generado por las industrias de tratamiento de pieles (curtiembres) en su gran mayoría son negativos dando origen a efluentes líquidos, residuos sólidos y emisiones gaseosas contaminantes para el ambiente. Sin embargo, existe también un impacto positivo, el cual se ve en la mejora de la economía, ya que estas industrias aportan valor a la sociedad con la creación de puestos de trabajo y a la vez productos terminados para su exportación. (14)

En la mayoría de los casos, si es que no es en todos, los límites máximos permitidos sobrepasan los rangos fijados por la legislación y normativa ambiental, lo cual permite inferir que esto genera consecuencias negativas en el normal desenvolvimiento de factores ambientales. Según el grado de importancia de los problemas ambientales, la contaminación de los efluentes líquidos es la de mayor preocupación debido a que se deben pensar en soluciones rápidas y plasmarlas para evitar consecuencias graves. Luego de esta, y en un plano no menos importante aparecen la contaminación por residuos sólidos, emisiones gaseosas contaminantes y el uso excesivo de agua. (2)



#### 1.3.4. LEGISLACIÓN AMBIENTAL EN EL PERÚ

##### **Ley general del ambiente No 28611**

La ley dictada el 13 de octubre de 2005, está compuesta por 4 títulos y 153 artículos. Esta ley fue rectificada por las siguientes normativas: Decreto Legislativo N° 1055, Ley N° 29263, y Ley N° 29895. Dicho dictamen permite regular las acciones dedicadas a la protección del ambiente con el fin de mejorar la calidad de vida de los seres humanos y el crecimiento de la nación a través de la prevención, protección y restauración del medio ambiente.

La Ley General del Ambiente permite que el gobierno promueva el tratamiento de aguas residuales para su reutilización, estableciendo como prioridad el logro de la calidad necesaria para su reutilización, sin dañar la salud de los seres humanos, el medio ambiente o las actividades en las que se rehúsan.

Además, determina que, las empresas o personas naturales podrán percibir del Estado, una previa autorización para el desecho de aguas residuales domésticas, industriales o de diversas actividades que realicen, siempre que tal desecho no altere la calidad de las aguas como principal centro receptor, ni altere su reúso para nuevos objetivos.

De igual manera, dicha ley establece los Límites Máximos Permisibles que indica los parámetros que deben cumplir antes de ser un desecho de tales efluentes.

##### **Política nacional del ambiente y gestión ambiental**

Gestión Ambiental (art. 13-40) Artículo 32.- Del Límite Máximo Permissible (Modificación D.L No 1055) 32.1 El Límite Máximo Permissible - LMP, es el análisis de la concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, que caracterizan a un efluente o una emisión, que al sobrepasarse puede producir consecuencias negativas

para la salud, al bienestar humano y al medio ambiente. Su ejecución se exige legalmente por la respectiva autoridad indicada. Según el parámetro en particular a que se refiera, la concentración o grado podrá ser expresada en máximos, mínimos o rangos. 32.2 El LMP guarda coherencia entre el nivel de protección ambiental establecido para una fuente determinada y los niveles generales que se establecen en los ECA. La implementación de estos instrumentos debe asegurar que no se exceda la capacidad de carga de los ecosistemas, de acuerdo con las normas sobre la materia.

### **Ley General De Aguas: Decreto Ley N° 17752**

La ley fue dictada el 24 de junio de 1969, y sus normas y alteraciones legislan sobre la materia del ámbito nacional, estableciendo que las aguas sin excepción de alguna son de propiedad del estado y que su dominio es inalienable e imprescriptible.

No existe propiedad privada de las aguas ni derechos adquiridos sobre estas. El consumo justificado y racional del agua, solo se brinda en armonía, con el interés social y el crecimiento del país, (art-1). Además, establece que “Ningún desecho de residuos sólidos, líquidos o gaseosos podrá ser efectuado en las aguas marítimas o terrestres del país sin la previa autorización de la Autoridad Sanitaria”. (D.S. N° 261-69-AP, Art 57).

### **Reglamento de Estándares de Calidad Ambiental para Agua (D.S. N° 002-2008-MINAM).**

El presente reglamento establece los estándares nacionales de calidad ambiental para el agua. También, nos indica los parámetros según la categoría del agua como se observa en las tablas 1 y 2.

Valores máximos admisibles (VMA) de las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario D.S. N° 021-2009-VIVIENDA

Art. 1° FINALIDAD, ÁMBITO Y OBLIGATORIEDAD DE LA NORMA.-  
Dicha norma regula a través de Valores Máximos Admisibles los flujos de aguas residuales industriales en el sistema de alcantarillado sanitario a fin de evitar el deterioro de las instalaciones, infraestructura sanitaria, maquinarias, equipos y asegurar su adecuado funcionamiento, garantizando la sostenibilidad de los sistemas de alcantarillado y tratamiento de aguas residuales. Los VMA, se aplican en el ámbito nacional y son de obligatorio cumplimiento para todos los usuarios que efectúen descargas de aguas residuales no domésticas en el alcantarillado sanitario; su cumplimiento es exigible por las entidades prestadoras de servicios de saneamiento (SEDAPAL).

Art. 3° DEFINICIÓN DE VALORES MÁXIMOS ADMISIBLES (VMA).-  
Se entiende por Valores Máximos Admisibles (V.M.A.), ese valor de la concentración de elementos, sustancias o parámetros físicos y/o químicos, que caracterizan a un efluente industrial que será desechado a la red de alcantarillado sanitario, que al sobrepasar sus parámetros aprobados provoca daño al instante o progresivo a las instalaciones, infraestructura sanitaria, tratamiento de aguas residuales y tiene influencias negativas en los procesos de tratamiento de aguas residuales. (15)

**Tabla 1: Valores Máximos Admisibles.** <sup>15</sup>

| PARÁMETROS                    | UNIDAD | EXPRESIÓN | V.M.A |
|-------------------------------|--------|-----------|-------|
| Demanda Química de Oxígeno    | mg/L   | DQO       | 1000  |
| Demanda Bioquímica de Oxígeno | mg/L   | DBO5      | 500   |
| Sólidos Suspendidos Totales   | mg/L   | S.S.T.    | 500   |
| Aceites y Grasas              | mg/L   | -         | 100   |



**Tabla 2: Valores Máximos Admisibles de Metales Pesados.<sup>15</sup>**

| PARÁMETROS           | UNIDAD | EXPRESIÓN                     | V.M.A |
|----------------------|--------|-------------------------------|-------|
| ALUMINIO             | mg/L   | Al                            | 10.0  |
| ARSÉNICO             | mg/L   | As                            | 0.5   |
| BORO                 | mg/L   | B                             | 4.0   |
| CADMIO               | mg/L   | Cd                            | 0.2   |
| CIANURO              | mg/L   | CN                            | 1.0   |
| COBRE                | mg/L   | Cu                            | 3.0   |
| CROMO<br>HEXAVALENTE | mg/L   | Cr (VI)                       | 0.5   |
| CROMO TOTAL          | mg/L   | Cr                            | 10.0  |
| FIERRO               | mg/L   | Fe                            | 2.0   |
| MANGANESO            | mg/L   | Mn                            | 4.0   |
| MERCURIO             | mg/L   | Hg                            | 0.02  |
| NIQUEL               | mg/L   | Ni                            | 4.0   |
| PLOMO                | mg/L   | Pb                            | 0.5   |
| SULFATOS             | mg/L   | SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> | 500   |
| SULFUROS             | mg/L   | S <sup>-2</sup>               | 5.0   |
| ZINC                 | mg/L   | Zn                            | 10.0  |

## 1.4. TRATAMIENTO PARA EFLUENTES CONTAMINADOS CON METALES PESADOS

### 1.4.1. PRECIPITACIÓN

El tratamiento se ejecuta por medio de diversos procedimientos. El proceso más común de los efluentes en las industrias curtiembre superpone una etapa inicial de tratamiento en la que se precipita el total de los efluentes usando sales de hierro. Es aquí cuando el sulfuro se precipita como sulfuro de hierro. A su vez, también lo hacen las proteínas y el cromo. El agua que escapa de la sedimentación se clarifica, mientras que los DQO y DBO<sub>5</sub> caen en 50 % a 60 %. (16)

Sin embargo, este procedimiento causa mayor cantidad de lodo el cual es bastante fácil de caer en la putrefacción y están muy contaminados por compuestos de cromo (de 10 g a 50 g por Kg de materia seca), lo que quiere decir que solo pueden depositarse en un relleno sanitario.

Con el tiempo se ha comprobado que no es posible conseguir una deshidratación eficaz de lodo, por lo cual, dificulta su eliminación, generando problemas en la disposición.

Por las enormes cantidades de lodos generadas y por las complicaciones que aparecen, este procedimiento hoy en día se aplica cada vez menos.

### 1.4.2. RECUPERACIÓN DE CROMO

Este elemento es utilizado en curtido, recurtido, y a la vez también en el teñido. Son en las industrias reconocidas por su tamaño, en las que la recuperación del cromo ha botado excelentes resultados, debido a que trae consigo una importante reducción en los gastos de obtención de estos compuestos y en su poder contaminante.

Se ha calculado que dicha disminución de los gastos alcanzados de esta manera se aproxima a los costos del proceso de la restauración. La precipitación del cromo se realiza a través de soda o cal, sustancias que se usan como elementos neutralizadores. Lo que continúa es la deshidratación mecánica del lodo escamoso antes de hacer otra disolución para así regresarlo a la producción. Sin embargo, la precipitación se alcanza también con óxido de magnesio. Aunque necesita el uso de una técnica de precipitación especial, ya que este compuesto no es fácil de disolverse.

El punto positivo de dicho proceso es que logra el espesamiento mecánico del lodo, de tal forma que en su redisolución se genere una concentración de cromo que sea convenientemente elevada. (16)

Sea cual sea el proceso de recuperación, se tendrá que cumplir con determinadas condiciones:

1. Lavar correctamente la piel en tripa previo a agregar el piquelado.
2. Agregar curtientes de cromo sin aditivo alguno.
3. Usar una mínima cantidad de grasa. (17)

## 1.5. MICROBIOLOGIA

### 1.5.1. METODOS DE AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

El manejo de muestras contaminadas o cultivos mixtos en los que se pueden encuentran gran variedad de microorganismos, lo primero que se debe hacer, para su estudio posteriormente, es el aislamiento. Es decir, la separación y purificación de cada uno de los integrantes microbianos de la muestra a analizar. (18)

Estos métodos de aislación se basan en inmovilizar las células microbianas de superficie de los medios en los cultivos sólidos. Cuando se deposita una célula bacteriana en algún lugar del medio de cultivo, la bacteria quedará inmovilizada en ese punto, y en él se empezará a reproducir gracias a la absorción de los nutrientes presentes en el medio. Las nuevas células que se producen permanecerán de la



misma manera inmóvil y tras varias generaciones se conforma lo que denominamos anteriormente una "colonia". Las cuales son visibles en el medio de cultivo, las colonias formadas presentan diferentes características, dependiendo del microorganismo que la genera. Esto permite distinguir las diferentes poblaciones microbianas que se logran formar en la muestra sembrada, pudiendo realizar un "repique" a estos cultivos a otro medio de cultivo, lo que se considera cepas puras, ya que poseen un sólo tipo de microorganismo. (19)

### 1.5.2. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

Para la caracterización microbiológica de bacterias, mayormente se utiliza la tinción de Gram que es una técnica que procede con cuatro simples pasos fundamentales: tinción, fijación, decoloración y contratinción o segunda tinción. Esta técnica se basa en la coloración de las bacterias, pero además también permite diferenciarlas. El cristal violeta es el primer colorante que se utiliza, el cual tiene afinidad por el peptidoglicano, es decir que teñirá de morado o azul violeta a todas las bacterias presentes. Posteriormente, como segundo reactivo se utiliza el lugol que actúa como mordiente, esto quiere decir que induce la formación de complejos insolubles de cristal violeta, yodo y proteínas ribonucleares dentro de la célula.

Las bacterias conocidas como Gram positivas tienen una amplia pared de peptidoglicano, estas forman más complejos (cristal violeta - yodo), es decir que las bacterias Gram positivas retienen el colorante. Además, la pared de las bacterias Gram positivas poseen una mayor cantidad de ácidos no saturados, estos muestran gran afinidad por los agentes oxidantes, es decir por el Lugol. Por el contrario, las bacterias conocidas como Gram negativas llevan consigo una capa delgada de peptidoglicano, esto hace que las bacterias formen menos complejos que las bacterias Gram positivas.

A continuación, se realiza la decoloración, donde las bacterias Gram positivas y Gram negativas tienen un comportamiento diferente. Las bacterias Gram negativas contienen una membrana externa con gran número de lipopolisacáridos, esta forma parte de su pared celular. Las grasas se destruyen de inmediato cuando

entran en contacto con el alcohol acetona, por lo que la membrana externa se desestabiliza, quedando liberado el cristal violeta. Es por este motivo que se vuelve a teñir pero con safranina o fucsina, formando un color rojo.

En tanto las bacterias Gram positivas son diferentes, estas resisten la decoloración, ya que el decolorante actúa cerrando los poros, no permitiendo que el complejo cristal violeta - yodo pueda escapar. (20)

Por otro lado, las pruebas bioquímicas son las que posibilitan determinar las características metabólicas de las bacterias a estudio para su identificación. La mayoría de estas pruebas se ejecutan de manera rápida. Las pruebas necesitan para su lectura el crecimiento del microorganismo con una previa incubación entre 18 a 48 horas; en este conjunto está gran parte de pruebas que descubren componentes metabólicos o pruebas que identifican cuan sensible es un microorganismo a una determinada sustancia luego de ser cultivada en medios de identificación que llevan consigo un sustrato a metabolizar. Sin embargo, ciertas pruebas logran ejecutarse de manera veloz luego de una incubación entre 2 a 6 horas. Estas son reacciones enzimáticas cromogénicas o pruebas convencionales alteradas (existen discos o tabletas que se ofrecen con sustratos cromogénicos usarlos individualmente).

#### 1.6. BACTERIAS RESISTENTES AL CROMO

En la naturaleza se puede encontrar poblaciones bacterianas aisladas capaces de realizar funciones vitales como crecimiento, reproducción, entre otras; donde estas especies pueden llegar a asociarse, esto se conoce como consorcio (21).

Un consorcio se define como un grupo de varias poblaciones microbianas de diferentes especies. En comparación a otras especies aisladas los consorcios son más eficientes y se adaptan mejor al ambiente (22).

Los llamados consorcios microbianos llegan a tolerar de una mejor manera el tiempo de limitación de nutrientes, por la variedad metabólica de las diferentes especies y por su gran habilidad para compartir los metabolitos junto con la

comunidad. El utilizar un consorcio microbiano tiene una gran ventaja, los consorcios son más tolerantes a los cambios del ambiente, tienen una mayor capacidad de manipulación y se adecúan a condiciones complejas. Ciertas clases de bacterias fueron halladas sobreviviendo en lugares contaminados de Cr (VI) como *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella*, *Bacillus* spp. y *Staphylococcus* (23)

## 1.7. CINETICA MICROBIOLOGICA

### 1.7.1. CRECIMIENTO MICROBIANO

"El crecimiento microbiano constituye el incremento de un número de microorganismos en el tiempo y no el incremento de tamaño de dichos microorganismos. Este incremento en la cantidad fomenta la creación de colonias y/o poblaciones. Debido a estos puntos en la microbiología, el crecimiento es analizado no en microorganismos individuales sino por poblaciones. Estas bacterias se generan mayormente por fisión binaria. El producto de esta fisión binaria son dos células hijas por cada célula madre, así, cada una de las células se divide en dos, dos en cuatro y así sucesivamente. En el momento que se siembran microorganismos en un medio de cultivo adecuado, estos empiezan a dividirse rápidamente utilizando los nutrientes que brinda el medio de cultivo para producir otros microorganismos. Dicho procedimiento sigue hasta que uno de los nutrientes del medio de cultivo se termina y el desarrollo se detiene. Después de esto hay dos aspectos que se diferencian bastante que logran el crecimiento microbiano: uno estequiométrico, aquí la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y el otro cinético, el que dirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso" (24).

La microbiología predictiva va de la mano con la complicada dinámica del comportamiento de la población microbiana. "El crecimiento de los cultivos bacterianos a pesar de la gran complejidad del fenómeno, mayormente obedece a leyes básicamente elementales, estas ayudan a precisar ciertas características cuantitativas del ciclo del crecimiento, principalmente las tres constantes del crecimiento: crecimiento total, tasa del crecimiento exponencial y crecimiento



latente. Dichas especificaciones no son del todo arbitrarias y corresponden a elementos fisiológicos diferentes del ciclo de crecimiento” (25)

### **Curva de crecimiento**

La curva de crecimiento de determinado cultivo microbiano se puede dividir en cuatro partes distintas las que vienen a ser la fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

La fase de latencia es el tiempo de ajuste donde las células son transferidas de un medio al otro antes de comenzar con su crecimiento. Es en este momento donde se producen las enzimas vitales para que estas se desarrollen en un nuevo ambiente. Dicha fase no contempla un incremento de células, sin embargo existe una gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células (26).

La fase exponencial es en la cual los microorganismos crecen y se dividen hasta su nivel máximo, en función de su potencial genético, tipo de medio y condiciones en que crece. En esta etapa hay una relación lineal entre el logaritmo del número de células y el tiempo, aquí los microorganismos se dividen y duplican en número en intervalos regulares. Como cada célula se divide en un determinado momento ligeramente distinto al resto, la curva de crecimiento incrementa suavemente, y ya no realiza discretos saltos (27).

La fase estacionaria es resultado del agotamiento de los nutrientes disponibles o del efecto de acumulación de productos tóxicos de metabolismo que tienen como consecuencia la disminución de la velocidad del crecimiento. La transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria se caracteriza por un crecimiento sin equilibrio, a través del cual los distintos componentes celulares son sintetizados a diversas velocidades (28).

La fase de muerte es causada por diversos elementos: el más importante es el agotamiento de reservas celulares de energía. Como el crecimiento, la muerte

también tiene una fusión exponencial que puede ser representada por una caída lineal del número de las células viables en el tiempo (29).

## 1.8. CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

### 1.8.1. SUSCEPTIBILIDAD DE MICROORGANISMOS

La determinación de la sensibilidad bacteriana se puede realizar por diversos métodos, uno de ellos es mediante el método de disco fundido. Dicho análisis es básico para realizar estudios de la evolución y desarrollo de las resistencias de las bacterias que permite analizar los protocolos, como el de la antibioticoterapia experimental.

La evaluación de la Concentración Mínima Inhibidora (CMI) es la determinación de la sensibilidad de una bacteria frente a una sustancia, como los antimicrobianos. (30) Dicho análisis brinda información de la sensibilidad de las bacterias sensibles (S), intermedia (I) y resistente (R).

- Sensible, hay una gran probabilidad de éxito en el caso de un tratamiento a la dosis principal.
- Resistente, si la probabilidad de éxito es nula o baja.
- Intermedia, éxito es imprevisible. Es posible lograr un efecto en determinadas condiciones (grandes concentraciones locales o aumento de la dosis).

Existen diversas técnicas que permiten calcular de forma habitual y semicuantitativa, la CMI. Se efectúa mediante:

- Dilución: Medio sólido y Medio líquido (micro/macrodilución)
- Difusión en agar: Disco placa y E test
- Automatizados y Mecanizados (31)

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### **2.1. MATERIALES**

##### 2.1.1. MUESTRAS Y/O UNIDADES BIOLÓGICAS:

Se utilizó un consorcio microbiano, aislados de efluentes de la curtiembre del PIRS.

##### 2.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

###### 2.1.2.1. MATERIAL DE VIDRIO

- Probeta de 500 mL
- Probetas de 100 mL
- Matraces 250 mL
- Beakers de 100 mL
- Pipeta de 2 mL
- Pipeta de 5 mL
- Pipeta de 10 mL
- Placas Petri
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Propipeta
- Pipeta Pasteur
- Micropipetas de 0-10  $\mu$ L
- Micropipetas de 0-20  $\mu$ L
- Micropipetas de 10-50  $\mu$ L
- Micropipetas de 20-100  $\mu$ L



- Micropipetas de 100-1000  $\mu$ L
- Puntas de micropipetas
- Bureta
- Bagueta
- Papel filtro
- Microfiltro
- Cámara de newbager
- Viales
- Tapas para viales
- Embudo
- Tubos ependorff
- Tubos falcom

### 2.1.3. INSUMOS Y REACTIVOS QUÍMICOS

- Agua Destilada
- Etanol BAKER ANALYZED™
- Lugol HYCEL
- Cristal violeta HYCEL
- Safranina HYCEL
- Esmalte transparente
- Aceite de inversión
- Agar
- Medio LB

#### 2.1.4. EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN

- Cámara de flujo laminar vertical V30/70 - TELSTAR
- Agitador magnético
- Pastilla de agitador
- Baño María MERMMET
- Estufa MERMMET
- Espectrofotómetro CARY60
- Centrifuga 5702 RH
- Desecador
- Mechero
- Microscopio óptico CELESTRON
- Incubadora MERMMET

#### 2.1.5. OTROS

- Mechero Bunsen
- Algodón de uso medicinal.
- Jeringa 10 mL.
- Espátula.
- Asa de Khole
- Escalímetro

#### 2.1.6. SOFTWARE

- Microsoft Office Excel Professional Plus 2013 (Microsoft Corporation, Redmon, Whashington, EEUU)

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO A PARTIR DE UN EFLUENTE DE INDUSTRIA CURTIEMBRE.

#### 2.2.1.1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se recolectó a partir de los efluentes de la zona industrial de curtiembres situada en el Parque Industrial de Río Seco (PIRS), en el distrito de Cerro Colorado, Arequipa (Fig. 2.1). La muestra fue tomada en recipientes oscuros y estériles. Posteriormente, fue trasladada al laboratorio de investigación INNOVERGY de la “Universidad Católica de Santa María”. (32)



**Fig. 2.1** Curtiembres del PIRS

#### 2.2.1.2. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA Y BIOQUÍMICAMENTE DE UN CONSORCIO MICROBIANO.

Se preparó un medio de cultivo para el aislamiento de los microorganismos, este medio fue Luria Bertani Broth (LB).



Se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de la muestra del efluente industrial de curtiembre en el medio de cultivo LB, utilizando el método agotamiento o por estría con ayuda de un asa de Kolle. Este método se realizó por triplicado.

Posteriormente, se preparó medio de cultivo LB con 500 mg/L de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (Dicromato de Potasio) para seleccionar los microorganismos con potencial degradativo de cromo.

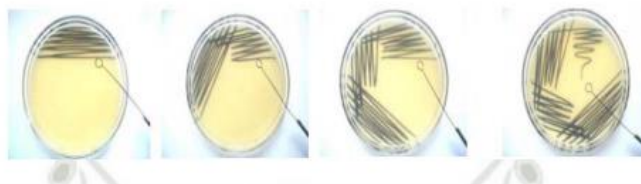
Se replicaron los microorganismos que crecieron en medio LB. Utilizando el método anterior, de estría o agotamiento. De igual manera, realizando el sembrado por triplicado de cada uno de los cultivos. (33)

Las placas sembradas se dejaron a temperatura ambiente por un tiempo de 48 horas.

Procedimiento del método de agotamiento:

- Esterilizar el asa de Kolle por flameado directo en un mechero, en la cámara de flujo laminar.
- Obtener la muestra a sembrar con un asa y suspenderla en un extremo de la placa con medio de cultivo, haciendo estrías (líneas) de un extremo a otro (primer cuadrante).
- Flamear el asa, dejar enfriar e iniciar estrías desde el cuadrante primero y expandirlas hasta el cuadrante dos.
- Flamear el asa, dejar enfriar en el extremo e iniciar estrías desde el cuadrante dos y expandirlas hasta el cuadrante tres.
- Flamear el asa, dejar enfriar en el extremo e iniciar estrías desde el cuadrante tres y expandirlas hasta el cuadrante cuatro.

Como se muestra en la figura 2.2 (19).



**Fig. 2.2 Modo de siembra por agotamiento** <sup>19</sup>

### 2.2.1.3. CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL CONSORCIO MICROBIANO

Para la caracterización macroscópica, se evaluó el tiempo de crecimiento de las colonias, tomando en cuenta las características morfológicas de cada colonia.

### 2.2.1.4. CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL CONSORCIO MICROBIANO

Inmediatamente después de las 48 h de se realizó la caracterización microscópica de las colonias obtenidas en las diferentes placas que contenían Medio LB con  $K_2Cr_2O_7$ , se realizó la tinción de Gram siguiendo el manual de Christian Gram (34). Para lograr una adecuada tinción de Gram, se colocó una gota de suero fisiológico en cada lámina portaobjetos y con ayuda de una Asa de Kolle, se tomó una asada de cada placa (una pequeña porción de la colonia), se dispersó la gota de suero fisiológico, con el fin de que al momento de observar en el microscopio, la muestra no esté muy concentrada. De inmediato, las muestras se fijaron en calor. Se empezó a colocar los reactivos, primero se le agregó el cristal violeta (entre dos o tres gotas), se dejó actuar por un minuto y se enjuagó con agua destilada, después se agregó lugol, también se dejó actuar por un minuto y se volvió a enjuagar con agua destilada, seguido se agregó el alcohol acetona para la decoloración del cristal violeta y se dejó actuar por 30 segundos, se enjuagó nuevamente con agua destilada y se adicionó safranina, la cual cumple la función de actuar como colorante de contraste,

se dejó actuar por un minuto, y finalmente se enjuagó la muestra con agua destilada y se esperó que lamina portaobjetos seque. La muestra fue observada al microscopio a diferentes dimensiones (10 X, 40 X y 100 X). Donde se denominarán a las 5 cepas aisladas con las letras: A, B, C, D y E.

## 2.2.2. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS MICROORGANISMOS.

### 2.2.2.1. PRUEBA DE TSI (TRIPLE SUGAR IRON).

La prueba de TSI es utilizada para la determinación de fermentación de la glucosa, lactosa y sacarosa, además de la determinación de producción de H<sub>2</sub>S y la producción de gases o CO<sub>2</sub>. Se prepararon 30 mL de medio TSI, se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta lograr su disolución. Posteriormente, en 5 tubos de ensayo se colocaron 5 mL de medio en cada uno. Se llevó al autoclave a 121 ° C y 15 p.s.i por 15 minutos. Se dejó enfriar en posición de medio fondo. Finalmente, se inocularon todos los tubos por el método de picadura con una asa recta o en hilo, esto se realizó con las 5 bacterias y se dejó incubando por 24h.

### 2.2.2.2. PRUEBA DE LIA (AGAR LISINA HIERRO).

La prueba bioquímica de LIA, se utiliza para determinar la producción de dos enzimas: lisina descarboxilasa y lisina desaminasa, también utilizada para determinar la producción de H<sub>2</sub>S. Se prepararon 30 mL de medio LIA, se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta lograr su disolución. Posteriormente, en 5 tubos de ensayo se colocaron 5 mL de medio en cada uno. Se llevó al autoclave a 121 ° C y 15 p.s.i por 15 minutos. Se dejó enfriar en posición de medio fondo. Finalmente, se inocularon todos los tubos por el método de picadura con una asa recta o en hilo, esto se realizó con las 5 bacterias y se dejó incubando por 24h.



#### 2.2.2.3.PRUEBA DE SIM (SULFURO INDOL MOTILIDAD)

La prueba bioquímica de SIM es utilizada para la identificación de la formación de sulfuro, producción de indol y motilidad. Se prepararon 30 mL de medio SIM, se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta lograr su disolución. Posteriormente, en 5 tubos de ensayo se colocaron 5 mL de medio en cada uno. Se llevó al autoclave a 121 ° C y 15 p.s.i por 15 minutos. Se dejó enfriar en posición de medio fondo. Finalmente, se inocularon todos los tubos por el método de picadura con una asa recta o en hilo, esto se realizó con las 5 bacterias y se dejó incubando por 24h.

#### 2.2.2.4.PRUEBA DE UREASA

La prueba bioquímica de UREASA nos ayuda a determinar la capacidad de hidrolizar la urea de un microorganismo. Se prepararon 30 mL de medio UREA, se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta lograr su disolución. Posteriormente, en 5 tubos de ensayo se colocaron 5 mL de medio en cada uno. Se llevó al autoclave a 121 ° C y 15 p.s.i por 15 minutos. Se dejó enfriar en posición de medio fondo. Finalmente, se inocularon todos los tubos por el método de picadura con una asa recta o en hilo, esto se realizó con las 5 bacterias y se dejó incubando por 24h.

#### 2.2.2.5.PRUEBA DE CITRATO DE SIMMONS

La prueba bioquímica CS determina la capacidad que tiene un microorganismo de utilizar el citrato como su única fuente de carbono y compuestos amoniacaes como su única fuente de nitrógeno, provocando así una alcalinización en el medio. Se prepararon 30 mL de medio CS, se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta lograr su

disolución. Posteriormente, en 5 tubos de ensayo se colocaron 5 mL de medio en cada uno. Se llevó al autoclave a 121 ° C y 15 p.s.i por 15 minutos. Se dejó enfriar en posición de medio fondo. Finalmente, se inocularon todos los tubos por el método de picadura con una asa recta o en hilo, esto se realizó con las 5 bacterias y se dejó incubando por 24h.

#### 2.2.2.6.KIA (KLIGLER IRON AGAR)

La prueba bioquímica KIA se basa en la determinación de la fermentación de lactosa y glucosa, además de la producción de H<sub>2</sub>S. Se prepararon 30 mL de medio KIA, se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta lograr su disolución. Posteriormente, en 5 tubos de ensayo se colocaron 5 mL de medio en cada uno. Se llevó al autoclave a 121 ° C y 15 p.s.i por 15 minutos. Se dejó enfriar en posición de medio fondo. Finalmente, se inocularon todos los tubos por el método de picadura con una asa recta o en hilo, esto se realizó con las 5 bacterias y se dejó incubando por 24h.

#### 2.2.2.7.OF (OXIDACION - FERMENTACIÓN)

La prueba bioquímica OF se basa en la detección de la capacidad de los microorganismos al usar los carbohidratos por la vía oxidativa o fermentativa. Se prepararon 60 mL de medio OF, en esta prueba se usaron 2 tubos, se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta lograr su disolución. Posteriormente, en 5 tubos de ensayo se colocaron 5 mL de medio en cada uno. Se llevó al autoclave a 121 ° C y 15 p.s.i por 15 minutos. Se dejó enfriar en posición de medio fondo. Finalmente, se inocularon todos los tubos por el método de picadura con una asa recta o en hilo, y adicionalmente a uno de los tubos se le colocó una gota de parafina, es el que mide la fermentación (en anaerobiosis), al contrario del otro tubo que no se le colocó nada, es el que mide la

oxidación (tiene contacto con el oxígeno) esto se realizó con las 5 bacterias y se dejó incubando por 24h.

#### 2.2.2.8.MRVP (ROJO DE METILO/VOGES PROSKAUER)

La prueba bioquímica rojo de metilo es un indicador de pH, es una prueba cuantitativa de la producción de ácido por la utilización de glucosa. Se prepararon 60 mL de medio MRVP, en esta prueba se usaron 2 tubos, se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta lograr su disolución. Posteriormente, en 5 tubos de ensayo se colocaron 5 mL de medio en cada uno. Se llevó al autoclave a 121 ° C, 15 p.s.i por 15 minutos. Se dejó enfriar en posición de medio fondo. Finalmente, se inocularon todos los tubos por el método de picadura con una asa recta o en hilo, esto se realizó con las 5 bacterias y se dejó incubando por 24h.

(35)

### 2.2.3. EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA BACTERIANA

#### 2.2.3.1.CURVA DE CRECIMIENTO

Se prepararon 5 matraces de 250 mL, uno para cada cepa, de caldo LB con 500 mg/L de Dicromato de potasio, se llevó al autoclave por 15 minutos a 121 °C y 15 p.s.i. y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se realizó una asada de cada cepa y se colocó en los matraces con medio para su adaptación en caldo por 24h. Luego, se prepararon 100 mL de caldo LB con 500 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$  para cada cepa, este procedimiento se realizó por triplicado en total fueron 15 matraces, 3 baterías por cada cepa. Seguidamente se hizo un inóculo de 100  $\mu$ L de cada bacteria A, B, C, D y E cultivadas inicialmente.

Posteriormente, se tomó una alícuota de 1.5 mL de cada bacteria en tubos eppendorf, este procedimiento se realizó cada dos horas durante el periodo de 48 h. Finalmente, se evaluó el crecimiento microbiano desde la hora de inoculación (hora 0) hasta las 48 h, se hizo por el método de



densidad óptica, utilizando el espectrofotómetro a longitud de onda de 625 nm (36).

### 2.2.3.2. CINÉTICA MICROBIANA

Para determinar la cinética microbiana primero se realizó la escala de McFarland, en primer lugar se preparó el  $H_2SO_4$  y  $BaCl_2$ . Siguiendo la tabla 3 para las mediciones exactas de cada tubo. (37)

**Tabla 3. Tabla de medidas para la escala McFarland <sup>37</sup>**

| Estándar | Concentración, cel/mL | Abs   | $H_2SO_4$<br>mL | $BaCl_2$<br>mL |
|----------|-----------------------|-------|-----------------|----------------|
| 1        | 3.00E+08              | 0.206 | 9.9             | 0.1            |
| 2        | 6.00E+08              | 0.407 | 9.8             | 0.2            |
| 3        | 9.00E+08              | 0.569 | 9.7             | 0.3            |
| 4        | 1.20E+09              | 0.774 | 9.6             | 0.4            |
| 5        | 1.50E+09              | 1.011 | 9.5             | 0.5            |
| 6        | 1.80 E+09             | 1.125 | 9.4             | 0.6            |
| 7        | 2.10E+09              | 1.32  | 9.3             | 0.7            |
| 8        | 2.40E+09              | 1.472 | 9.2             | 0.8            |

Para el tubo 1 se colocó 0.1 mL de  $BaCl_2$  y 9.9 mL de  $H_2SO_4$  en todos los tubos rotulados, obteniendo un volumen final de 10 mL en cada tubo. El procedimiento se realizó sucesivamente con cada tubo hasta el número 8. Finalmente se midió la absorbancia de los tubos y se realizó una curva. Seguidamente, se utilizó la ecuación de la curva obtenida de la escala de Mcfarland para hallar las concentraciones en cel/mL de cada bacteria y observar así las curvas de cinética microbiana.

El modelado del crecimiento microbiano se realiza usualmente en dos pasos. En primer lugar, la relación entre el incremento de la población microbiana (N) y el tiempo (t) se describe a través de un modelo matemático (modelo primario). En un segundo paso, la relación entre los parámetros del modelo primario y las condiciones ambientales se describe a través de un segundo modelo matemático (modelo secundario).

El modelo propuesto por Baranyi y Roberts (1994), es uno de los más extendidos para el modelado del crecimiento microbiano en la actualidad. Este modelo describe el crecimiento como una cinética de primer orden de ratio  $\mu(t)$  que varía en función de las condiciones ambientales y según la fase en que se encuentre la población. En el período de fase exponencial, existe una relación lineal entre el logaritmo del número de células (o cualquier otra propiedad medible de la población) y el tiempo.

Los microorganismos se dividen y duplican en número en intervalos regulares.

Se muestran las relaciones lineales entre el tiempo y el número de células cuando aplicando logaritmo natural de la concentración celular. La aplicación de logaritmo permite que la relación entre las abscisas (tiempo) y las ordenadas (logaritmos del número de células) pase a ser lineal. La representación gráfica puede ser utilizada para el cálculo de la cinética de la fase exponencial de crecimiento, para relacionar algunos parámetros involucrados en esta fase de la curva de crecimiento. La pendiente es el ratio entre el incremento de  $x$  y el incremento de  $y$  en la curva. La pendiente permitirá relacionar el tiempo ( $t$ ) con el número de microorganismos en la muestra, considerándose como la tasa de crecimiento bacteriano (37).

#### 2.2.4. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CROMO

Se prepararon 100 mL de medio LB para 5 placas, se llevó al autoclave por 15 minutos a 121 °C y 15 p.s.i, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después se colocaron 500  $\mu$ L de inóculo de las bacterias sobre cada una de las superficies de los medios de cultivo. Posteriormente, se hicieron 4 pozos sobre la superficie de los medios de cultivo con ayuda de una punta estéril. Seguidamente, en cada uno de los pozos se vertió 100  $\mu$ L de cromo a diferentes concentraciones: 500mg /L, 1000 mg/L, 1500 mg/L y 2000 mg/L. Luego, se dejó reposar por 30 minutos aproximadamente. Finalmente, las placas se dejaron incubando a

temperatura ambiente durante 24 h. Pasado este período de tiempo, las placas fueron leídas e interpretadas con el método Kirby Bauer. (38)

## 2.2.5. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADATIVA DE CROMO POR EFECTO DEL CONSORCIO MICROBIANO

Para la selección de cepas con capacidad degradativa de cromo, se prepararon 100 mL de medio LB con 500 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$ , para la proliferación de las bacterias y su adaptación en medio líquido. Luego de las 24 h se colocó 1 mL de cada muestra en matraces solamente con cromo y agua destilada, el experimento se realizó por triplicado. Posteriormente se llevó a incubación por un periodo de 10 días. Pasado este periodo se tomaron 5 mL de cada muestra, se centrifugó por 10 minutos a 5000 rpm. Finalmente se tomaron 1.5 mL de cada uno de los tubos y se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de 540 nm. Para obtener una curva con mayor exactitud se tomaron alícuotas cada 2 días y se leyeron en el espectrofotómetro. (39)

### 2.2.5.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE CROMO

Se pipetearon volúmenes crecientes de la solución patrón de cromo, utilizando pipetas mecánicas previamente calibradas, y se completó el volumen final con agua destilada. Se adicionaron a cada patrón 0.5 mL de ácido sulfúrico 1:1 y agitar con varilla de vidrio. El pH estuvo alrededor de 2. Se añadieron 1.0 mL de solución de difenilcarbazida, se agitó y se dejó reposar 5 a 10 minutos hasta que desarrolló color. Finalmente, se leyeron las muestras a 540 nm con celdas de 5 cm (50 mm) de paso óptico (40).

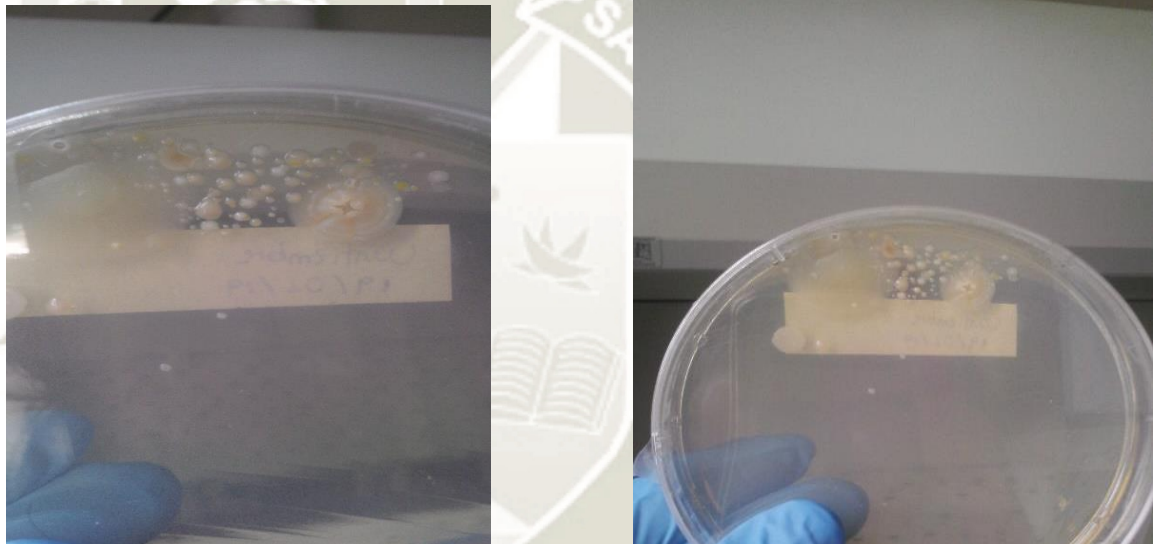


## CAPITULO III:

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Aislamiento y caracterización del consorcio microbiano obtenido de una muestra de efluente de curtiembre

Luego de haber sembrado el efluente de la industria curtiembre PIRS, primero en placas con medio LB, donde se mantuvieron en incubación por un periodo de 48 horas a temperatura ambiente y se observaron la muestra de las colonias tal como se muestra en la figura 3.1.

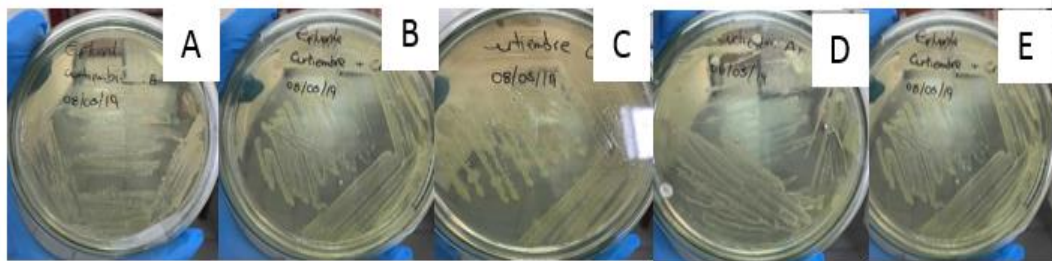


**Fig. 3.1 Colonias formadas a partir de efluente de curtiembre**

El medio de cultivo LB es un medio que es adecuado para el aislamiento y crecimiento microbiano de bacterias específicamente debido a la composición que muestra este medio.

Se observaron diferentes colonias en las placas hallando diferentes poblaciones bacterianas, entre estas se observaron colonias con colores entre blancos y cremas, algunas de las colonias se observaron rugosas, otras lisas y otras redondas correctamente definidas.

Para la selección de las cepas, se preparó medio de cultivo LB con 500 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$  para así aislar exclusivamente las bacterias que tienen capacidad de resistir concentraciones elevadas de cromo (VI). De la misma forma, se observaron diferentes colonias en las placas A, B, C, D y E, entre estas se observaron colonias con colores entre blancos y cremas, algunas de las colonias se observaron rugosas, otras lisas y la mayoría fueron redondas correctamente definidas.



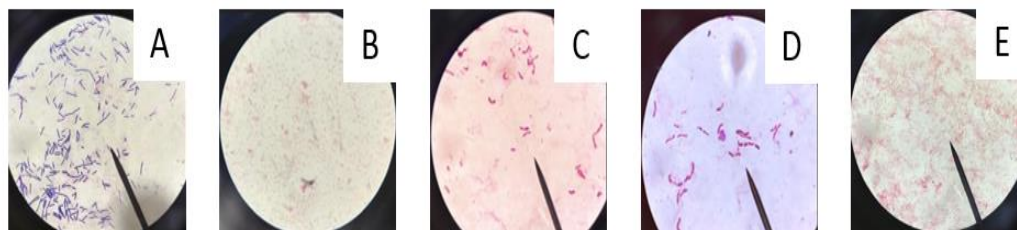
**Fig. 3.2 Cepas aisladas resistentes a cromo (VI)**

En la figura 3.2 se observan todas las cepas que fueron aisladas, empezando de izquierda a derecha, en la figura A se pueden ver colonias redondas definidas de color blanco, en la B se pueden observar colonias redondas definidas correctamente y lisas de color crema, en la C se puede ver colonias mucosas redondas definidas de color blanco cremoso, en la cepa D se puede observar colonias redondas entre cremas y blancas y en la cepa E se observan colonias regulares de color crema. Se obtuvieron cepas que teóricamente podrían de ser *Bacillus*, *Enterobacterias*, *Klebsiella* o *Pseudomona* debido al crecimiento observado en las placas.

Según trabajos de investigación existe evidencia que dichas bacterias son encontradas en efluentes contaminados con cromo, como es el caso de Flores en “Biorremediación de metales tóxicos en efluentes mineros aplicando biosorción” donde obtuvo resultado de colonias con las mismas características morfológicas.  
(40)

### 3.2. Caracterización microbiológica de las bacterias

Se realizó la tinción de Gram de todas las cepas, donde se observaron mayormente bastones, algunos en cadenas como lo muestran las siguientes figuras.



**Fig. 3.3 Tinción Gram de bacterias seleccionadas A, B, C, D y E**

De izquierda a derecha, se puede observar en la figura 3.3 se observa todas las tinciones Gram que se realizaron a las 5 cepas aisladas. En la figura A se observó en el microscopio bastones entre azul oscuro y violeta. Lo que indicaría la presencia de bacilos Gram positivos. En la figura B se observaron bastones rojos indicando presencia de bacilos Gram negativos. En la figura C se observaron bastones algunos en cadenas de color rojizo indicando que hay presencia de bacilos Gram negativos. En la figura D también se observaron bastones rojizos indicando bacilos Gram negativos. Y finalmente, en la figura E se observó bacilos Gram negativos. Si comparamos los resultados obtenidos con otros antecedentes como la investigación de Islas-Espinoza, donde se trabaja “aislamiento e identificación de bacterias resistentes como del Río Lema, México” donde se encontraron resultados similares. Las cepas identificadas con tinción gram fueron *Klebsiella*, *Escherichia coli* y *Pseudomona*.

#### 3.2.1. Caracterización bioquímica de las bacterias.

Luego de haber realizado la caracterización microscópica de las bacterias, se realizó la caracterización bioquímica de cada cepa, observando que la mayoría de las bacterias fueron bacilos gramnegativos a excepción de una bacteria. Se realizaron pruebas bioquímicas como MRVP, TSI, LIA, SIM, CITRATO, OF, UREA Y KIA. Esta identificación fue posible según el manual de determinación



bacteriana de Bergey y el manual de identificación de bacterias de Cowan y Steel (41).

**Tabla 4. Resultado de pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias seleccionadas.**

|          | MRVP           |                 | TSI         |     |     | LIA         |     |     | SIM |       |           | CS  | OF    |          | UREA | KIA     |     |         |     |
|----------|----------------|-----------------|-------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|-------|-----------|-----|-------|----------|------|---------|-----|---------|-----|
|          | ROJO DE METILO | Voges Proskauer | PICO /FONDO | H2S | Co2 | PICO /FONDO | H2S | CO2 | H2S | INDOL | MOTILIDAD | +/- | OXIDA | FERMENTA | +/-  | GLUCOSA | CO2 | LACTOSA | H2S |
| <b>A</b> | +              | -               | K/K         | -   | -   | K/K         | -   | +   | -   | -     | +         | +   | -     | +        | +    | -       | -   | -       | -   |
| <b>B</b> | -              | +               | A/K         | -   | +   | K/A         | -   | +   | -   | -     | +         | +   | -     | -        | +    | +       | +   | -       | -   |
| <b>C</b> | +              | -               | A/A         | -   | +   | K/K         | -   | +   | -   | +     | -         | +   | -     | -        | -    | -       | -   | -       | -   |
| <b>D</b> | +              | -               | K/A         | -   | -   | K/A         | -   | +   | +   | -     | +         | +   | +     | +        | -    | -       | -   | -       | -   |
| <b>E</b> | +              | -               | A/A         | -   | -   | K/K         | -   | +   | -   | -     | +         | -   | +     | -        | -    | +       | +   | +       | -   |

A= *Bacillus subtilis*; B= *Enterobacter cloacae*; C= *Klebsiella oxytaca*; D= *Pseudomonas aureginosa*; E= *Escherichia coli*; K/A= metabolización de glucosa; A/A= metabolización de glucosa y fermentación de lactosa; K/K= No existe fermentación.

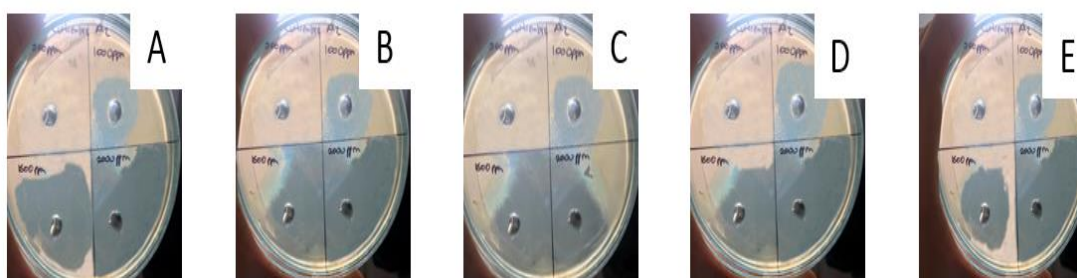
En la tabla 2 se observaron los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las 5 cepas A, B, C, D y E. Esta tabla se comparó con los resultados del “manual de determinación bacteriana” de Bergey, el libro de “Pruebas Bioquímicas de Identificación de Bacterias” de MacFaddin (42) y el libro de “Diagnostico Microbiológico” de Baile y Scott (43). Adicionalmente, se comparó la información obtenida del diagnóstico de la caracterización microscópica, y se pudo llegar a las siguientes identificaciones:

En la Cepa A se pudo identificar como una colonia de *Bacillus subtilis*, en la cepa B se pudo identificar como una colonia de *Enterobacter cloacae*, en la cepa C se identificó una colonia de *Klebsiella oxytaca*, en la Cepa D se identificó una colonia de *Pseudomonas aureginosa* y finalmente la cepa E se identificó como una colonia de *Escherichia coli*. Una vez identificadas cada una de las cepas que se obtuvieron, se realizó una investigación sobre antecedentes de estas bacterias, y en dicha información brinda que las 5 cepas identificadas, han sido utilizadas para numerosos estudios en el ámbito de tratamiento de efluentes con presencia de metales, sobre todo de cromo.

Comparando los resultados obtenidos con antecedentes como la investigación de Islas-Espinoza, se encontraron resultados similares, como las cepas de *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*. Siendo estas aisladas de un río en la ciudad de México contaminado con cromo.

### 3.3. Susceptibilidad de las bacterias a diferentes concentraciones de cromo.

Para la determinación de susceptibilidad de las bacterias ante el cromo se probaron 4 concentraciones diferentes 500 mg/L, 1000 mg/L, 1500 mg/L y 2000 mg/L. Se probaron estas concentraciones ya que quería probarse el valor máximo de susceptibilidad de las cepas, ya que en la caracterización del efluente que se realizó, se determinó que había 19.280 mg/L de cromo (ANEXO 2). Las placas fueron leídas e interpretadas con el método Kirby Bauer.



**Fig. 3.4 Placas de susceptibilidad de las cepas A, B, C, D y E a diferentes concentraciones de cromo**

Como se observa en la figura 3.4, la susceptibilidad de las cepas A, B, C, D, y E. Pasadas las 24 horas todas las bacterias son susceptibles a 500 mg/L de cromo, lo cual es un resultado bueno ya que es un valor mayor a la concentración de cromo del efluente. Se puede observar, de izquierda a derecha, que la mayoría de cepas se empezaron a inhibir a 1000 mg/L hubo un crecimiento casi nulo, a 1500 mg/L y 2000 mg/L ya no se observa un crecimiento notable, indicando que las bacterias aisladas son resistentes a concentraciones altas de cromo.

El resultado fue positivo debido a que comparándolo con lo establecido por Maye Bernal en la publicación, “El Antibiograma de discos. Normalización de la Técnica de Kirby-Bauer”, en las 5 cepas a 500 mg/L se obtuvo un halo entre 1 a 3 mm encontrándose en zona de resistencia, es decir son susceptibles a esa concentración, sin embargo a concentraciones de 1000 mg/L en la cepa A se obtuvo un halo con diámetro 15 mm; en

la cepa B se obtuvo un halo de 13 mm; en la cepa C un halo de 15 mm; en la cepa D un halo de 18 mm y en la cepa E un halo de 17 mm; cuyos valores se encuentran en el rango propuesto en la tabla de esta publicación. A concentraciones de 1500 mg/L y 2000 mg/L las 5 cepas obtuvieron halos mayores a 29 mm encontrándose en la zona de sensibilidad, es decir no son resistentes a estas concentraciones

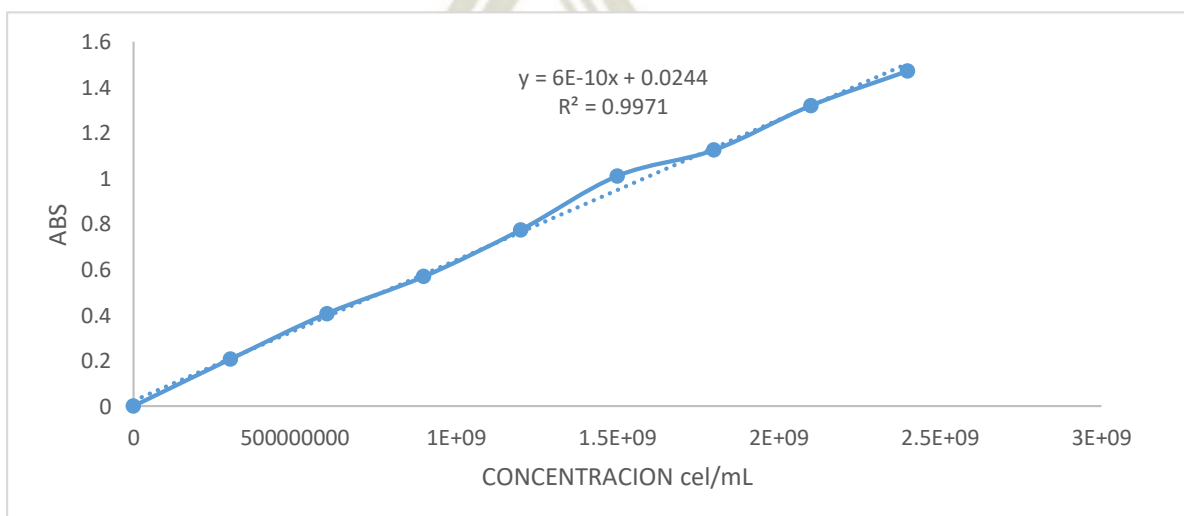
Estos resultados también pueden compararse con los resultados realizados en el Río Lema en la ciudad de México, por Avendaño, esta investigación identificó bacterias parecidas a las encontradas en el presente trabajo. Exponiéndolas hasta 500 mg/L, determinando que las mismas bacterias resistieron a esta concentración de cromo (VI), sin embargo en el presente trabajo se expusieron las bacterias hasta 2000 mg/L para determinar la máxima resistencia de dichas bacterias.

#### 3.4. Cinética microbiana de las bacterias aisladas.

##### 3.4.1. Curva de calibración de McFarland

Primero se realizó la curva de calibración donde evaluó la escala de MacFarland, esta curva se realizó para hallar las concentraciones de células por mililitro de cada cepa, obteniendo datos más exactos.

Se obtuvo una ecuación con una  $R^2$  de 0.9971 como se observa en la figura 3.5.

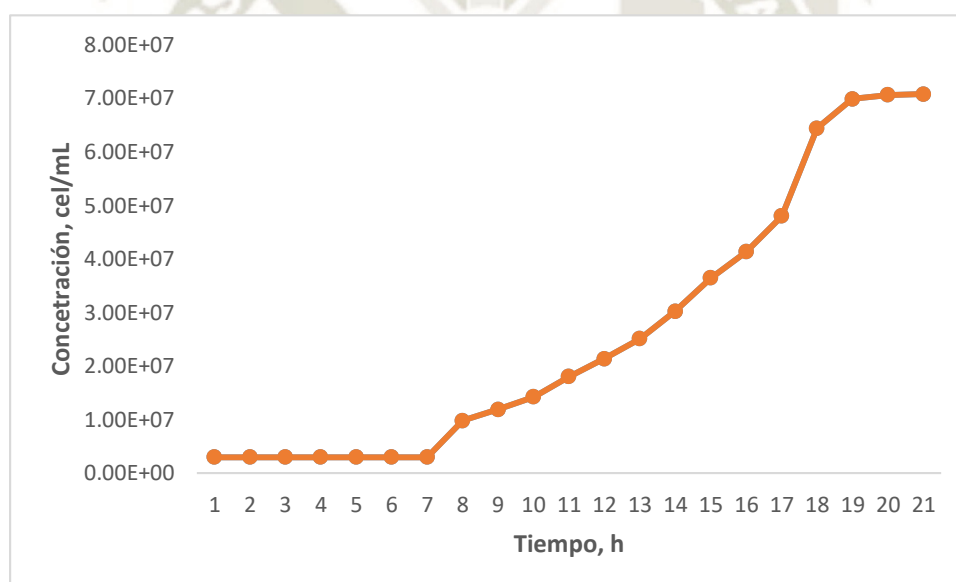


**Fig. 3.5** Curva de calibración de McFarland



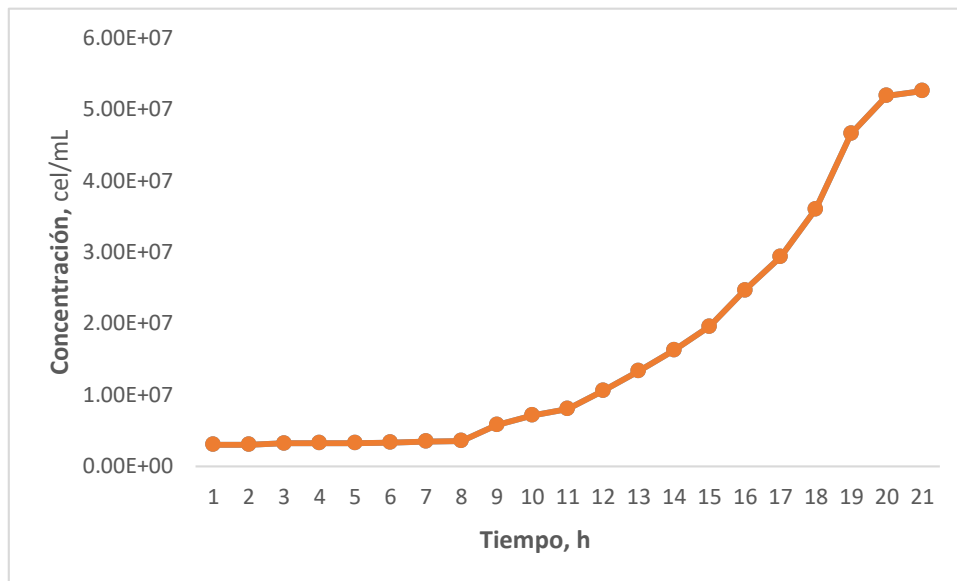
### 3.4.2. Crecimiento microbiano

Posteriormente, se realizó la curva de crecimiento de las 5 cepas con poder resistente a cromo evaluando el tiempo de crecimiento y su fase exponencial, se tomaron alícuotas cada dos horas por un periodo de 48 horas, es decir 20 tiempos, donde empezó la fase exponencial de las bacterias. Se inocularon 3 millones de células por cada cepa para tener un estándar. Posteriormente, se utilizó la ecuación anterior para determinar la concentración de células por mililitro de cada curva obtenida, obteniendo así, la cinética de cada cepa.



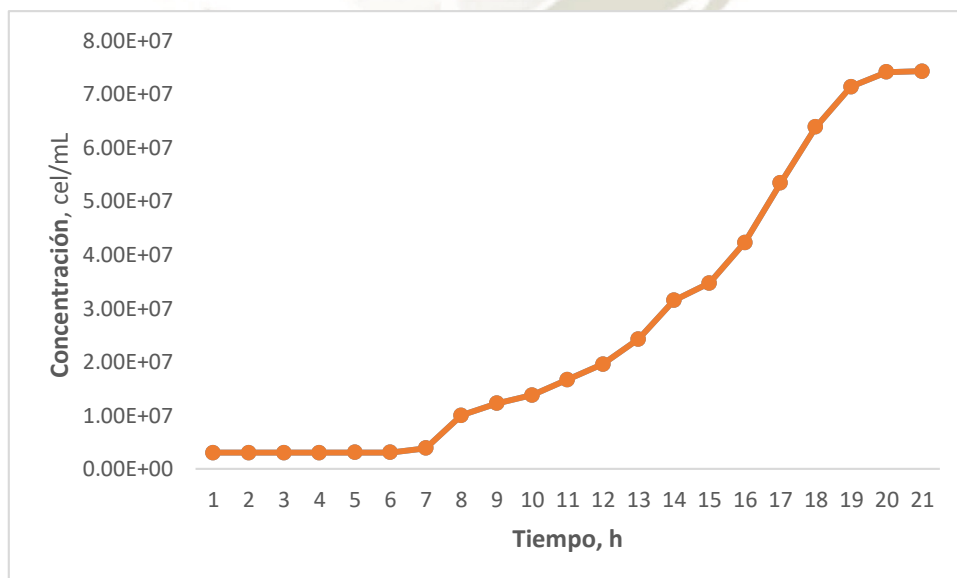
**Fig 3.6 Curva de crecimiento bacteriano de la cepa A**

En la figura 3.6 se puede observar el crecimiento microbiano de la cepa A, se observa que durante los 7 primeras horas hubo un periodo de adaptación, iniciando su crecimiento desde el tiempo 8 con una concentración de 9 millones de células por mililitro aproximadamente, incrementando el crecimiento hasta la hora 19 con una concentración de 70 millones de células por mililitro aproximadamente. Donde empezó la fase estacionaria de la cepa A



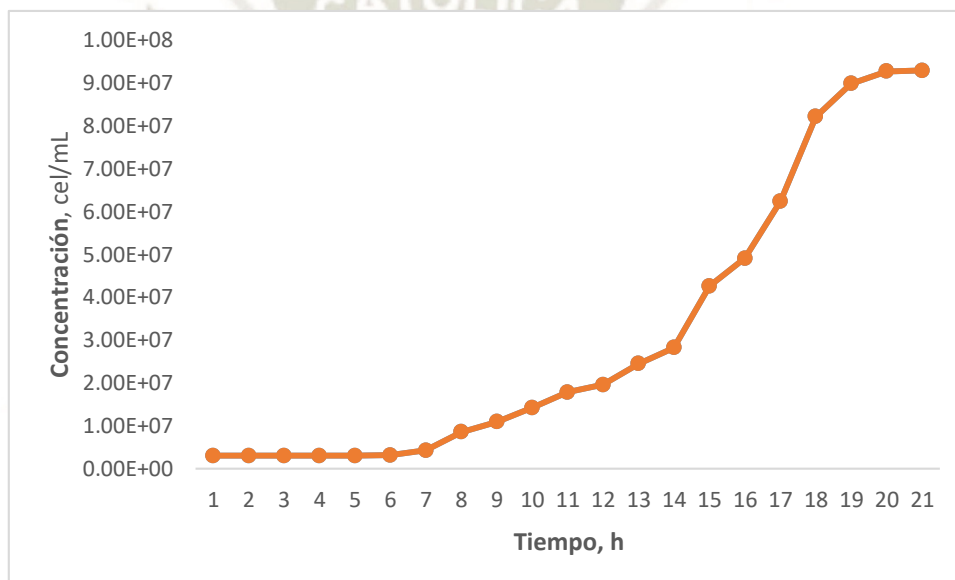
**Fig 3.7 Curva de crecimiento bacteriano de la cepa B**

En la figura 3.7 se puede observar el crecimiento microbiano de la cepa B, se observa que hubo una etapa de adaptación, luego inició su crecimiento desde la hora 9 con una concentración de 5 millones de células por mililitro aproximadamente, incrementando el crecimiento hasta la hora 20 con una concentración de 52 millones de células por mililitro aproximadamente. Donde empezó el tiempo estacionario de la cepa B.



**Fig. 3.8 Curva de crecimiento bacteriano de la cepa C**

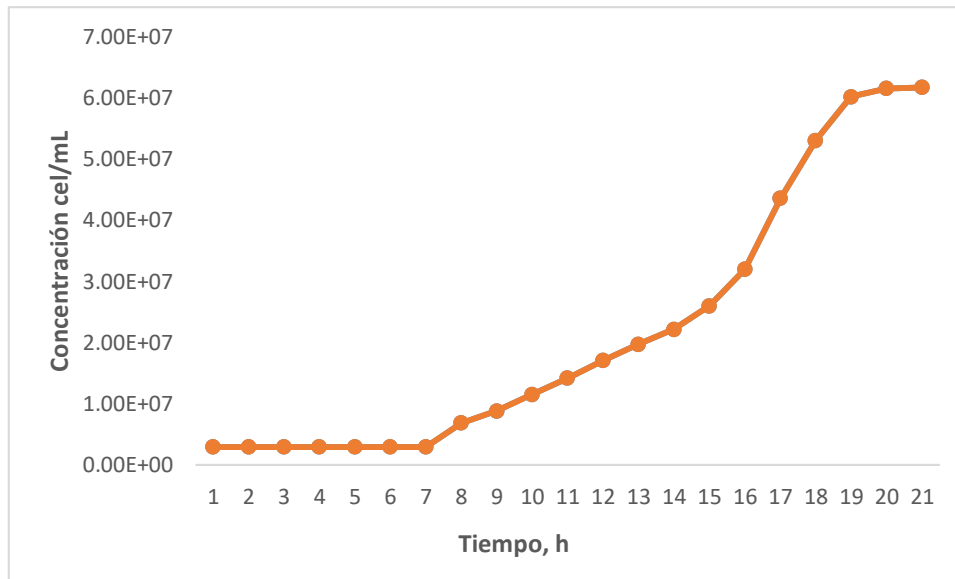
En la figura 3.8 se puede observar el crecimiento microbiano de la cepa C, se observa que inició su crecimiento desde la hora 8 con una concentración de 10 millones de células por mililitro aproximadamente, incrementando el crecimiento hasta la hora 20 con una concentración de 93 millones de células por mililitro aproximadamente. Donde empezó el tiempo estacionario de la cepa C.



**Fig. 3.9 Curva de crecimiento bacteriano de la cepa D**

En la figura 3.9 se puede observar el crecimiento microbiano de la cepa D, se observa que hubo una etapa de adaptación, luego se inició su crecimiento desde la hora 8 con una concentración de 9 millones de células por mililitro aproximadamente, incrementando el crecimiento hasta la hora 19 con una concentración de 74 millones de células por mililitro aproximadamente. Donde empezó el tiempo estacionario de la cepa D.



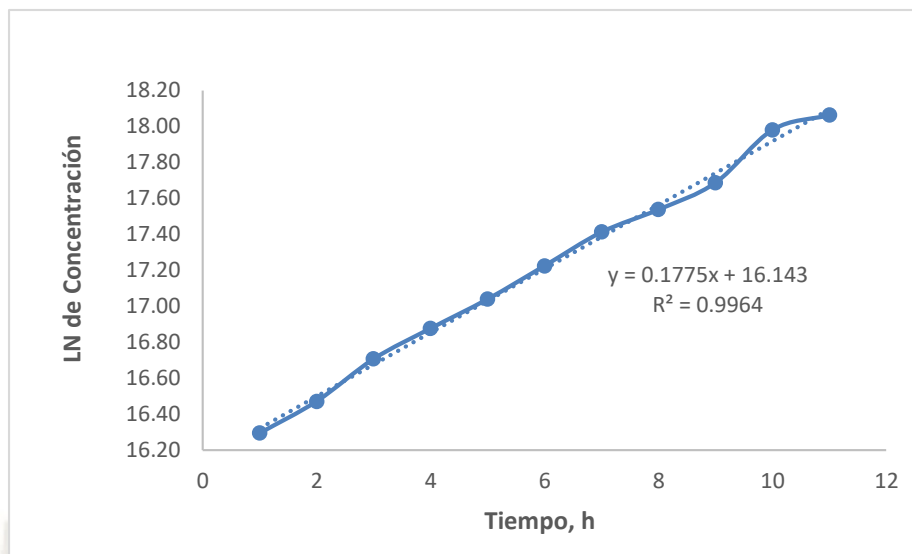


**Fig. 3.10 Curva de crecimiento bacteriano de la cepa E**

En la figura 3.10 se puede observar el crecimiento microbiano de la cepa E, se observa que hubo un periodo de adaptación hasta la hora 8, luego se inició su crecimiento desde la hora 9 con una concentración de 6 millones de células por mililitro aproximadamente, incrementando el crecimiento hasta el tiempo 20 con una concentración de 60 millones de células por mililitro aproximadamente. Donde empezó el tiempo estacionario de la cepa E.

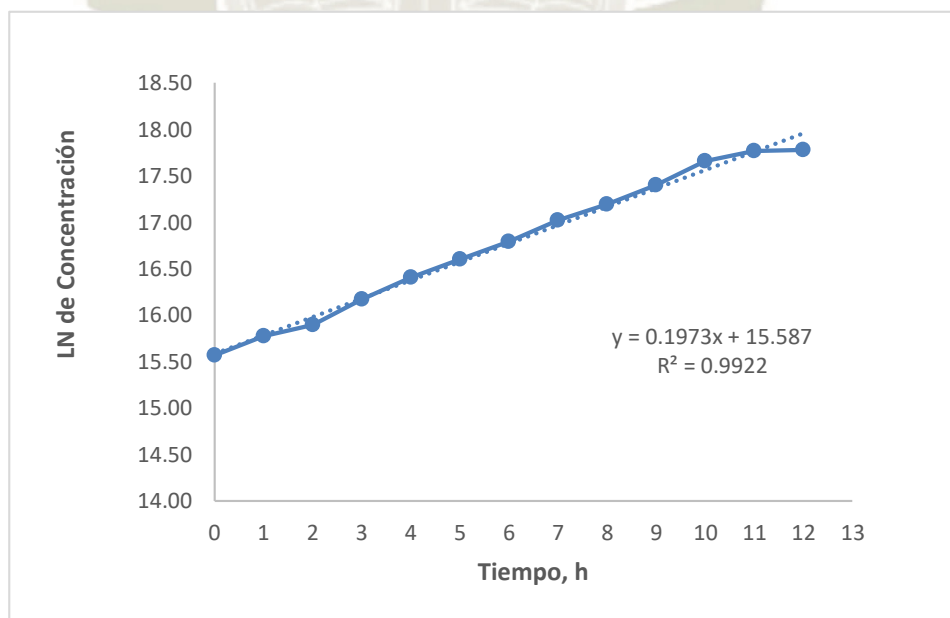
### 3.4.3. Cinética microbiana

Posteriormente, utilizando el modelo propuesto por Baranyi y Roberts (1994), que es uno de los más extendidos para el modelado del crecimiento microbiano en la actualidad, se realizó la determinación de la cinética de las 5 cepas.



**Fig. 3.11 Cinética de crecimiento bacteriano de la cepa A**

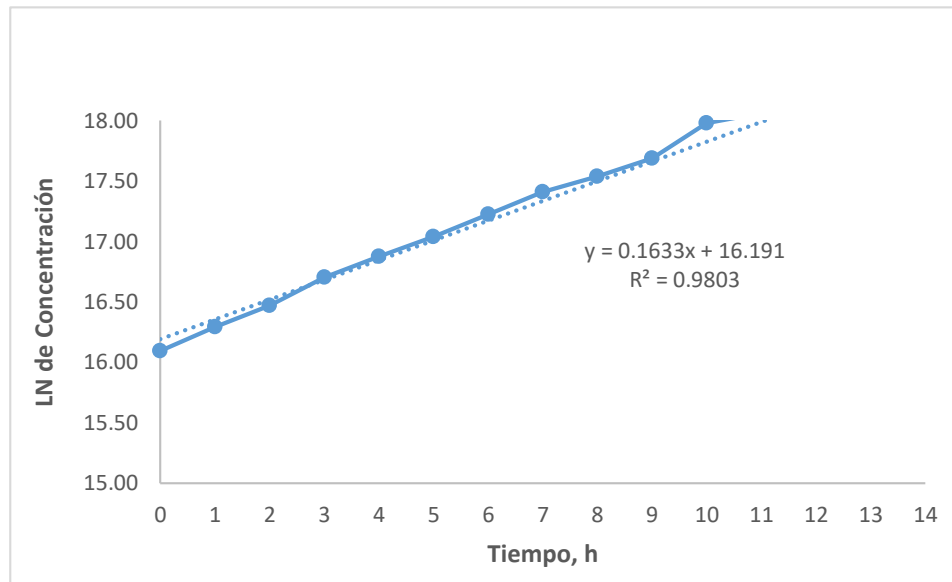
En la Figura 3.11 se muestra la recta lineal con un  $R^2$  de 0.9964. Se presenta la cinética de crecimiento bacteriano de la Cepa A con una ecuación  $y=0.1775x + 16.143$ , siendo la tasa de crecimiento o pendiente 0.1775.



**Fig. 3.12 Cinética de crecimiento bacteriano de la cepa B**

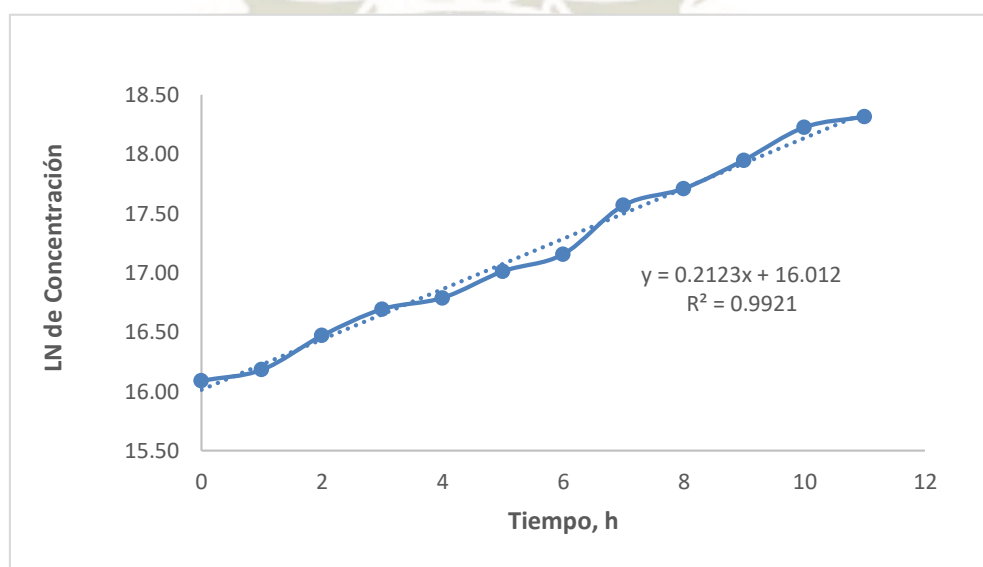
En la Figura 3.12 se muestra la recta lineal con un  $R^2$  de 0.9922. Se presenta la cinética de

crecimiento bacteriano de la Cepa B con una ecuación  $y=0.1973x + 15.587$ , siendo la pendiente 0.1973; expresando una tasa de crecimiento de 0.20 células por unidad de tiempo (horas).



**Fig. 3.13 Cinética de crecimiento de cepa C**

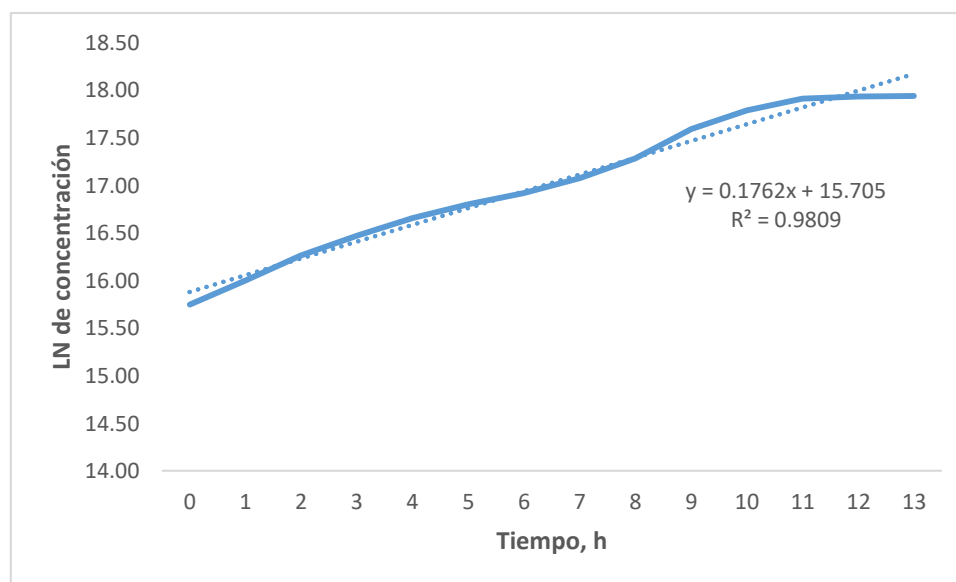
En la figura 3.13 se muestra la recta lineal con un  $R^2$  de 0.9803. Se presenta la cinética de crecimiento bacteriano de la Cepa C con una ecuación  $y=0.1633x + 16.191$ , siendo la pendiente 0.1633; expresando una tasa de crecimiento de 0.16 células por unidad de tiempo (horas).



**Fig. 3.14 Cinética de crecimiento bacteriano de la cepa D**



En la figura 3.14 se muestra la recta lineal con un  $R^2$  de 0.9921. Se presenta la cinética de crecimiento bacteriano de la Cepa D con una ecuación  $y=0.2123x + 16.012$ , siendo la pendiente 0.2123; expresando una tasa de crecimiento de 0.21 células por unidad de tiempo (horas).



**Fig. 3.15 Cinética de crecimiento bacteriano de la cepa E**

En la figura 3.15 se muestra la recta lineal con un  $R^2$  de 0.9809. Se presenta la cinética de crecimiento bacteriano de la Cepa E con una ecuación  $y=0.1762x + 15.705$ , siendo la pendiente 0.1762; expresando una tasa de crecimiento de 0.17 células por unidad de tiempo (horas).

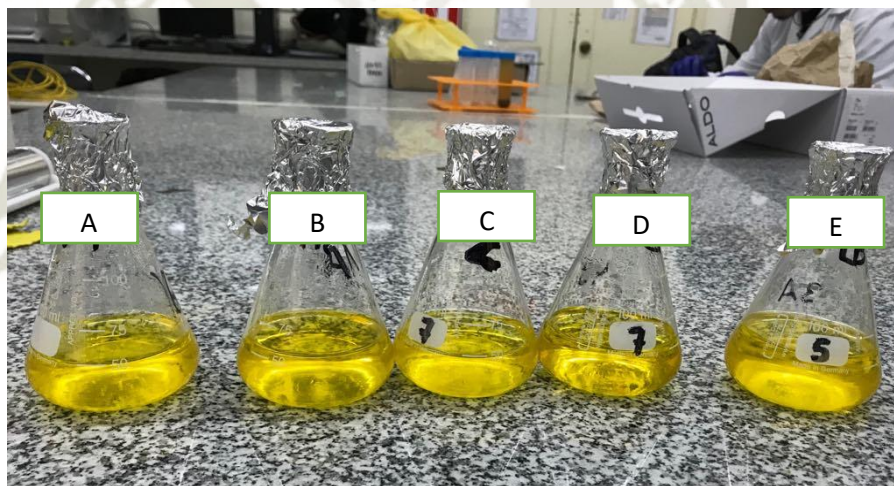
Con estos datos, se corrobora que según la cinética bacteriana presentada; se puede ordenar de forma decreciente considerando la tasa de crecimiento microbiano según Baranyi: primero a la cepa D, luego la cepa B, cepa A y, luego la cepa E y por último la cepa C.

Por otro lado, estos resultados comparado con lo que concluye Avendaño, con un trabajo de investigación sobre biorreducción de Cr (VI) a Cr (II) por bacterias resistentes a cromo, donde las bacterias *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Bacillus*, tuvieron el mismo comportamiento que los resultados obtenidos en la cinética microbiana. Donde la cepa *Bacillus* fue la que mejor crecimiento obtuvo, seguida de

*Enterobacter* y finalmente fue la cepa de *Pseudomona*, sin embargo la que mejor degradación obtuvo fue la cepa *Pseudomona credina*.

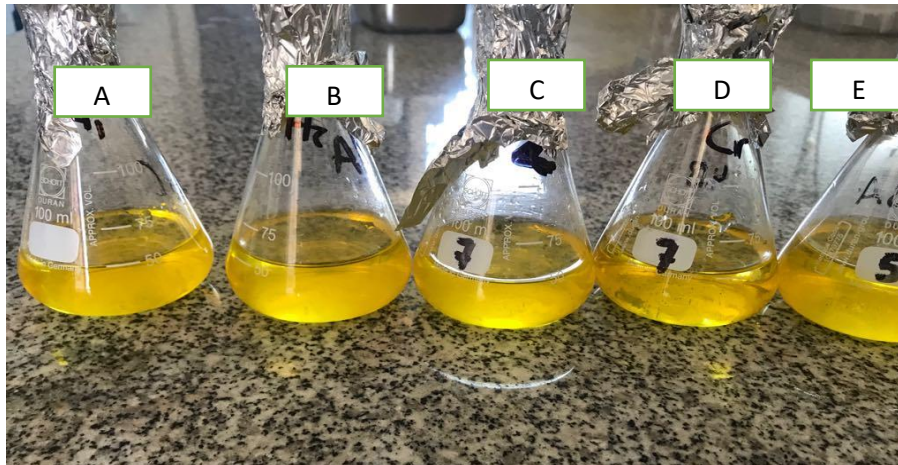
### 3.5. Determinación de la capacidad degradativa de cromo de las bacterias.

Pasado el periodo de 10 días, donde se mantuvieron a temperatura ambiente los 5 tipos de cepas obtenidas con poder resistente al cromo, se pudo observar a simple vista que las cepas B y E, no tuvieron un crecimiento esperado, debido a que no hubo ningún cambio de turbidez considerable, permanecieron casi con el mismo color del primer día de inóculo, es decir su poder degradativo de cromo es casi nulo. Como se observa en las figuras 3.16 y 3.17.



**Fig. 3.16 Primer día de inóculo de las bacterias con cromo**



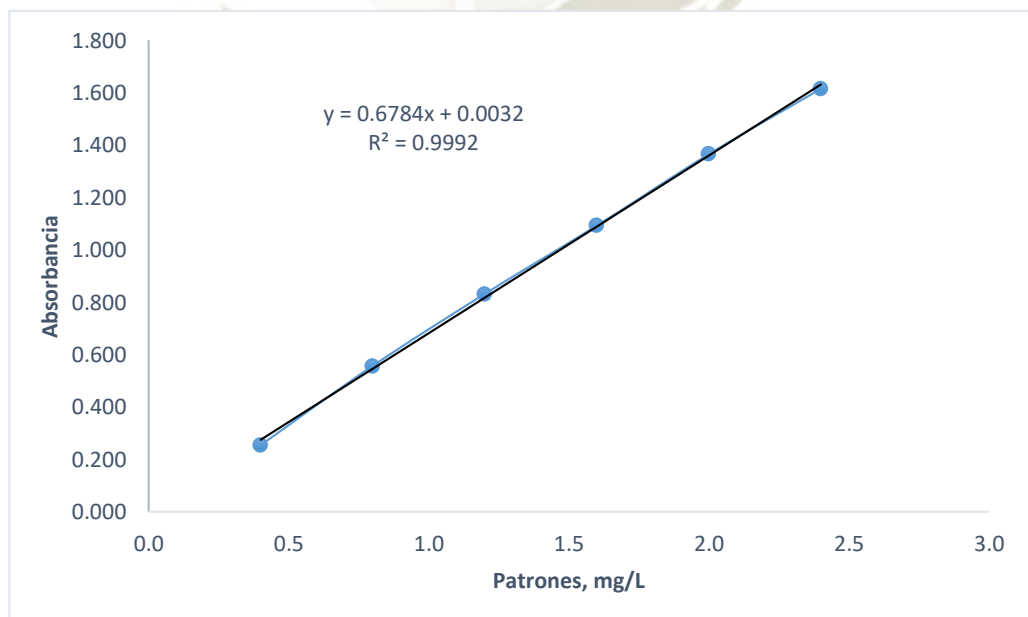


**Fig. 3.17 Día 10 del inóculo de las bacterias con cromo**

Sin embargo, para poder corroborar que las cepas degradaron el cromo se tomó una alícuota de cada batería cada dos días por un periodo de 10 días por triplicado y se llevó a una longitud de onda de 540 nm.

### 3.5.1. Curva de calibración de cromo

Primero se realizó la curva de calibración del cromo, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 200  $\mu\text{L}$  de difenilcarbazida con diferentes concentraciones de cromo, para lograr un estándar, donde se obtuvo una  $R^2$  de 0.9992 pudiendo considerarse confiable. Como se observa en la figura 3.18.

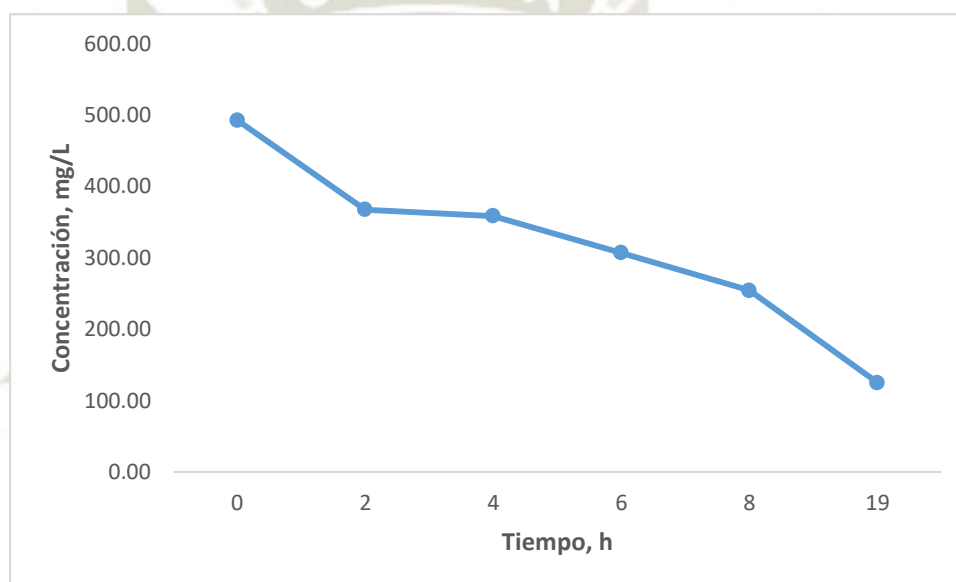


**Fig. 3.18 Curva de calibración del cromo (VI)**



### 3.5.2. Determinación de degradación de cromo (VI) de las bacterias

Se realizaron mediciones de absorbancia cada 2 días por un periodo de 10 días. Se realizó el mismo procedimiento que con la curva de la calibración, en diferentes fiolas de 10 mL donde se colocaron 40  $\mu\text{L}$  de cada inóculo con 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 200  $\mu\text{L}$  de difenilcarbazida, luego se enrazaron hasta los 10 mL con agua destilada y se midieron a 540 nm, Cabe mencionar que el inóculo inicial para las 5 cepas fue de 3000000 de células/mL. Con la ecuación obtenida anteriormente se determinaron las concentraciones de cromo en cada cepa y se obtuvieron las siguientes curvas:



**Fig. 3.19 Disminución de remoción de cromo (VI) de la cepa A**

En la figura 3.19 se observa una disminución de cromo durante los 10 días, de 500 mg/L disminuye notablemente en el día 2 a 350 aproximadamente, además se obtuvo el porcentaje de remoción de cromo de cada cepa con la siguiente fórmula:

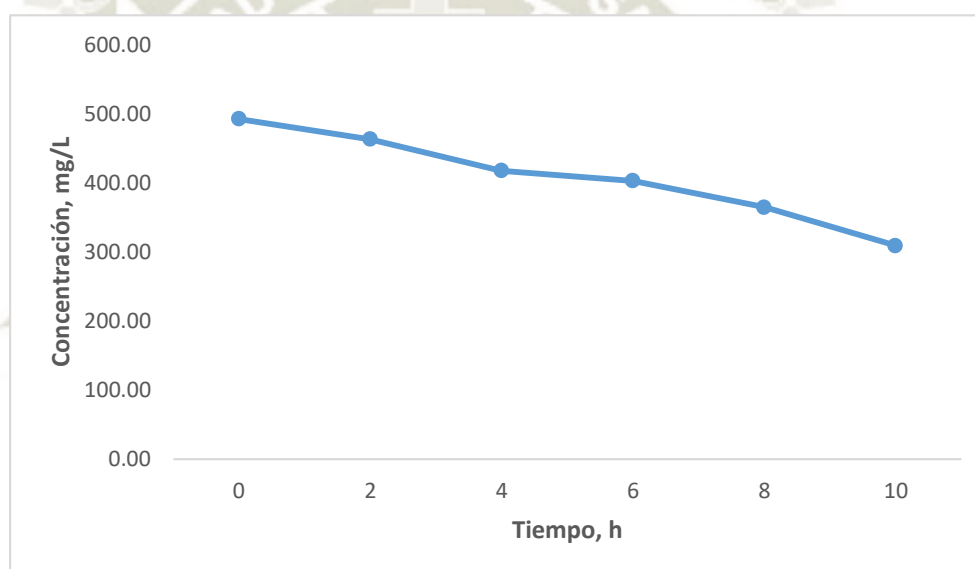
#### **Ecuación 1. Ecuación de porcentaje de remoción**

$$\text{Remoción, \%} = \frac{(\text{Concentración inicial} - \text{concentración final})}{\text{concentración inicial}} \times 100$$

$$\text{Remoción, \%} = \frac{(492.56 - 124.82)}{492.56} \times 100$$

$$\text{Remoción, \%} = 74 \%$$

Lo que indica que la cepa A, removió un 74 % de cromo (VI), pudiendo concluir que la bacteria aparte de resistir a concentraciones elevadas de cromo también hay posibilidades que lo degrade.



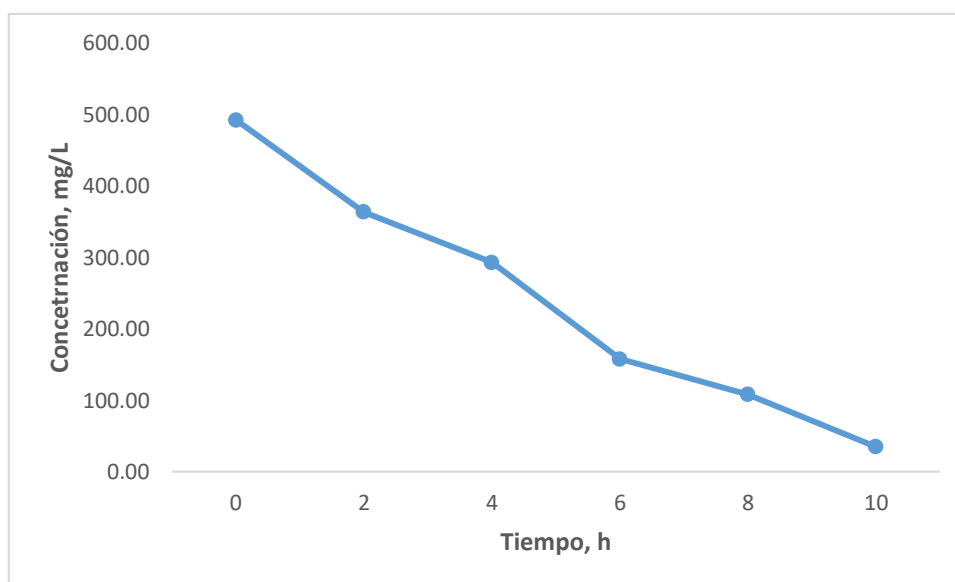
**Fig. 3.20 Curva de degradación de cromo de la cepa B**

En la figura 3.20 se observa la remoción de cromo de la cepa B, como se dedujo al principio esta bacteria no tuvo una buena degradación ya que no cambió su turbidez notablemente, y se pudo corroborar con las concentraciones obtenidas durante los 10 días. De 500 mg/L disminuyó hasta 309 en los 10 días, siendo valores muy bajos.

$$\text{Remoción, \%} = \frac{(492.56 - 309.07)}{492.56} \times 100$$

$$\text{Remoción, \%} = 37 \%$$

Lo que indica que la cepa B, removi6 tan s6lo un 37 % de cromo (VI) siendo un porcentaje muy bajo, pudiendo concluir que la bacteria es resistente a concentraciones elevadas de cromo pero las posibilidades que lo degrade es muy baja.



**Fig. 3.21 Curva de degradaci6n de cromo de la cepa C**

En la figura 3.21 se observa la remoci6n de cromo de la cepa C, la cual fue la que tuvo mejor crecimiento bacteriano y la turbidez de esta cepa cambi6 considerablemente, fue la cepa que mejor remoci6n realiz6. Se pudo observar que disminuy6 de 500 mg/L hasta 35 aproximadamente.

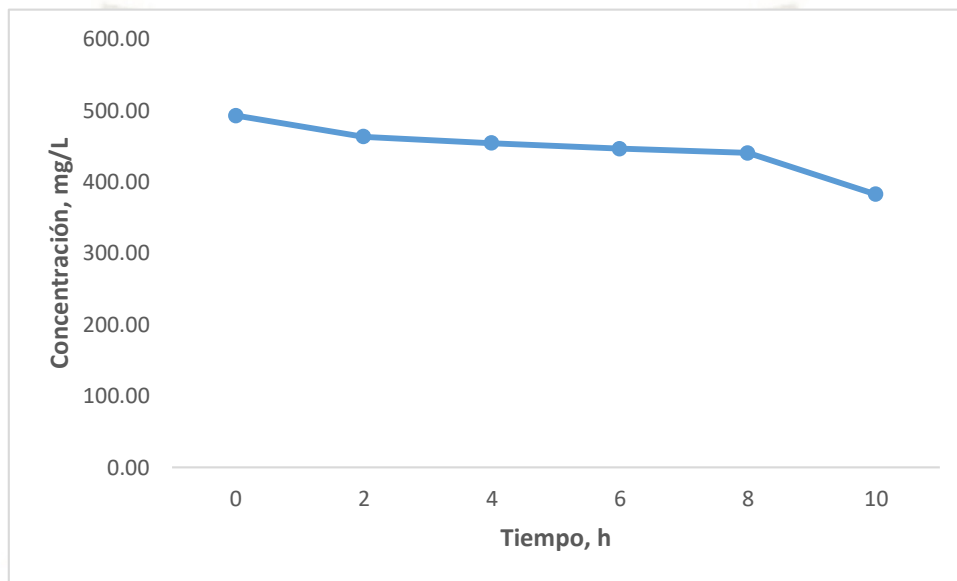
$$\text{Remoci6n, \%} = \frac{(492.56 - 35.19)}{492.56} \times 100$$

$$\text{Remoci6n, \%} = 92 \%$$

Lo que indica que la cepa C, removi6 un 92 % de cromo (VI) siendo un porcentaje muy alto, pudiendo concluir que la bacteria es resistente a concentraciones elevadas de cromo y cabe la gran posibilidad que esta bacteria metabolice dicho metal en un periodo de 10 d6as. Siendo



esta bacteria la que mejor comportamiento tuvo. Coincidiendo con varios antecedentes bibliográficos, como es el caso de Esparza y Flores, donde también obtuvieron la cepa *Klebsiella* como mejor bacteria degradativa, sin embargo no se encontró % de remoción, dando este trabajo un dato adicional.



**Fig. 3.22 Curva de degradación de cromo de la cepa D**

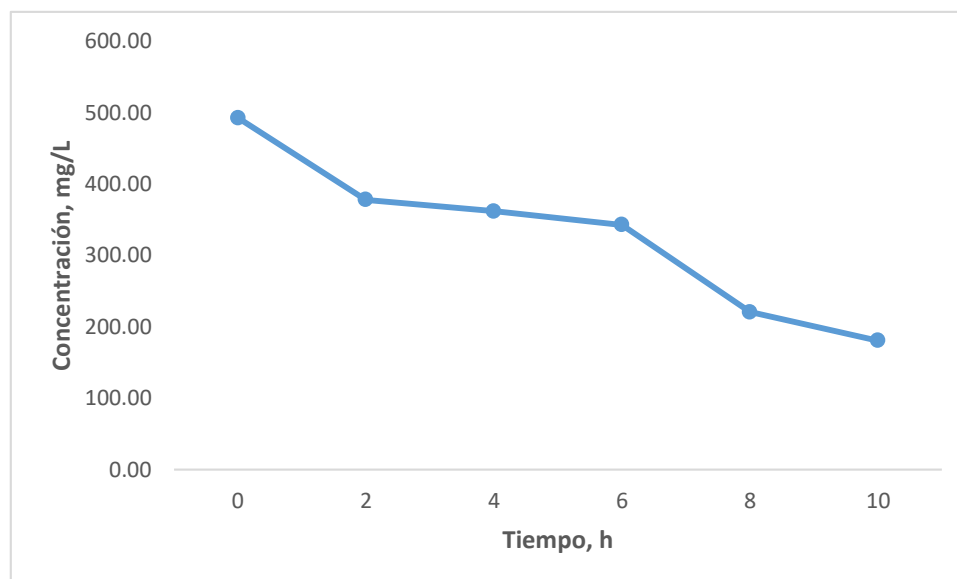
En la figura 3.22 se observa la remoción de cromo de la cepa D, la cual fue la que tuvo menos degradación de cromo, se observó desde un principio que la turbidez fue casi la misma desde el día 0, casi nulo el cambio. De 500 mg/L disminuyó a 380 aproximadamente, siendo este un valor casi nulo.

$$\text{Remoción, \%} = \frac{(492.56 - 382.52)}{492.56} \times 100$$

$$\text{Remoción, \%} = 22 \%$$

Lo que indica que la cepa D, removió un 22 % de cromo (VI) siendo un porcentaje muy bajo, pudiendo concluir que la bacteria es resistente a concentraciones elevadas de cromo pero no

hay posibilidades que esta bacteria metabolice dicho metal. Siendo esta bacteria la que tuvo un comportamiento muy bajo.



**Fig. 3.23 Curva de degradación de cromo de la cepa E**

En la figura 3.23 se observa la remoción de cromo de la cepa E al principio la turbidez de esta cepa tuvo un cambio, fue la segunda cepa que mejor remoción realizó. Disminuyó de 500 mg/L hasta 180 aproximadamente.

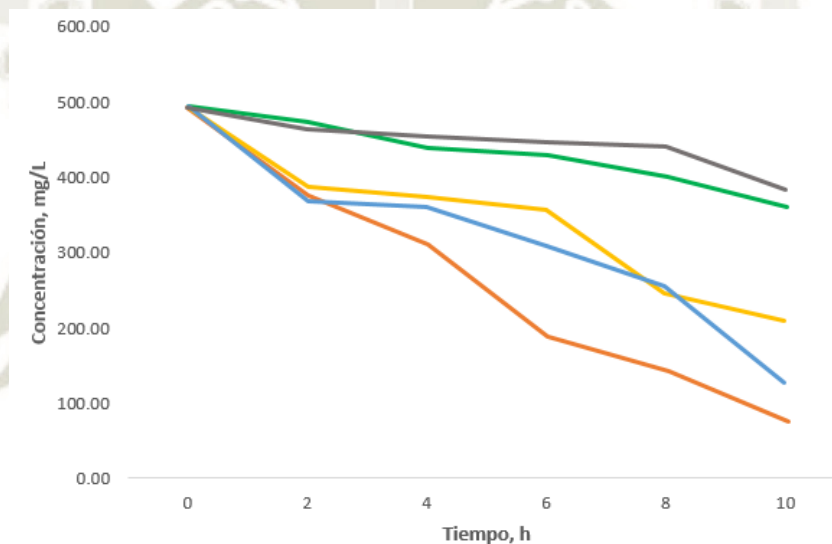
$$\text{Remoción, \%} = \frac{(492.56 - 180.57)}{492.56} \times 100$$

$$\text{Remoción, \%} = 63\%$$

Lo que indica que la cepa E, removió un 63 % de cromo (VI) siendo un porcentaje alto, pudiendo concluir que la bacteria es resistente a concentraciones elevadas de cromo y cabe la gran posibilidad que esta bacteria metabolice dicho metal en un periodo de 10 días. Siendo esta la segunda bacteria que mejor comportamiento tuvo. Coincidiendo este resultado con Isla, en el tema de reducción de *E.coli*, sin embargo esa investigación utiliza sólo 100 mg/L

de cromo. En este caso se utilizaron 500 mg/L, de igual manera fue una de las mejores bacterias que tuvo potencial degradativo.

Como se pudo observar todas las cepas lograron disminuir la absorbancia, es decir la concentración de Cromo (VI), durante 10 días deduciendo que las bacterias lograron degradar el cromo (VI) a cromo (III) como lo indica la investigación de Esparza. Puede ser también una opción que las bacterias absorban el cromo una investigación realizada en Jaén por Murgueitio, en este caso se determinó que la bacteria *Klebsiella* logró asimilar metales pesados.



**Fig. 3.24 Comparación de la capacidad de degradación de las 5 cepas**

Con estos datos, pudiendo concluir que según la degradación de cromo dada por las bacterias; como se observa en la figura 3.24, las cuales se pueden ordenar de forma decreciente considerando el % de remoción: primero a la cepa C con 92 %, luego la cepa A con 74 %, cepa E con 63 % y, luego la cepa B con 37 % y por último la cepa D con 22%.



## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES

- PRIMERA:

Se logró aislar, caracterizar e identificar un consorcio microbiano de un efluente de curtiembre, conformado por 5 cepas diferentes, con capacidad degradativa de cromo (VI), de las cuales 3 degradaron mejor dicho metal.

- SEGUNDA:

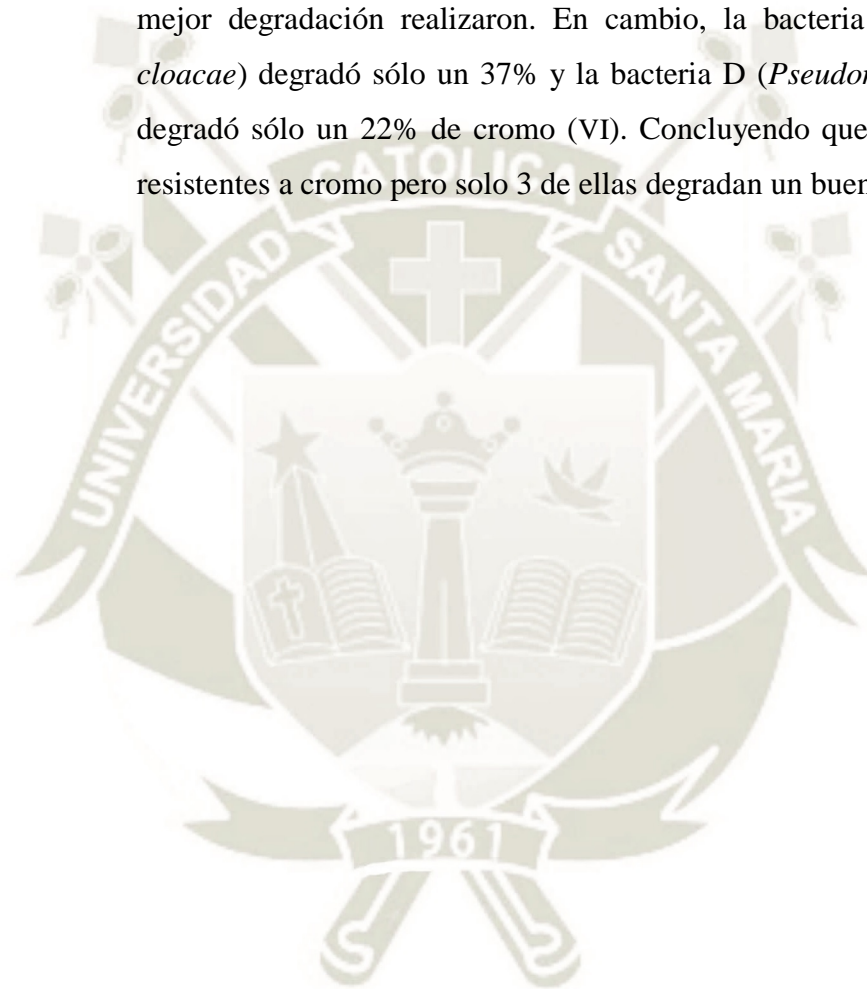
Se aislaron 5 cepas diferentes, las cuales fueron adaptadas a condiciones de cromo donde sobrevivieron las cepas. Con la realización de la caracterización de las bacterias microbiológica y bioquímica se pudo concluir que las cepas aisladas fueron bacilos Gram positivos y negativos: *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella ocycata*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*.

- TERCERA:

En la determinación de susceptibilidad se concluye que todas las cepas son resistentes a 500 mg/L, ya que obtuvieron halos menores a 3 mm encontrándose en zona de resistencia, es decir son susceptibles a esa concentración. A concentraciones de 1000 mg/L se obtuvieron halos entre 13 mm y 19 mm cuyos valores se encuentra en zona sensible. Y a concentraciones de 1500 mg/L y 2000 mg/L las 5 cepas obtuvieron halos mayores a 29 mm encontrándose también, en la zona de sensibilidad; es decir no son resistentes a estas concentraciones

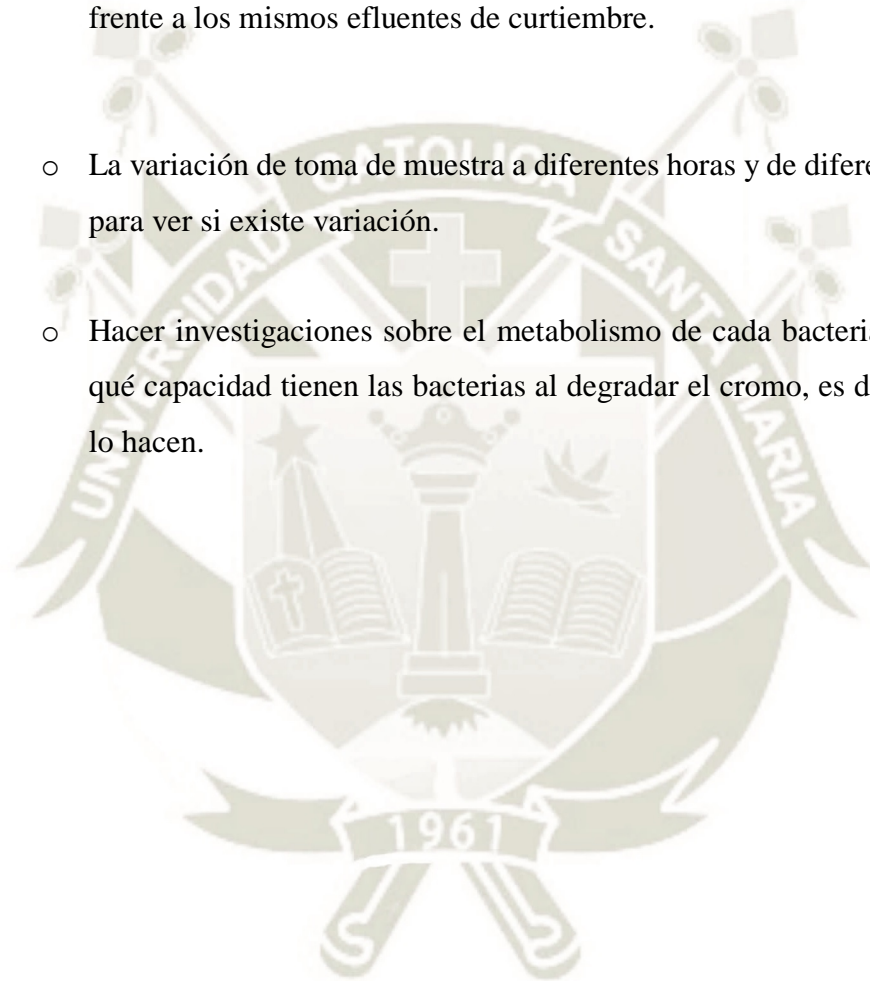
- CUARTA:

La degradación de cromo se realizó por un periodo de 10 días, exponiendo a las bacterias exclusivamente a cromo sin ningún nutriente adicional. La bacteria C (*Klebsiella oxycata*) degradó un 92% de cromo (VI), la bacteria A (*Bacillus subtilis*) degradó un 74% de cromo (VI) y la bacteria D (*Escherichia coli*) que degradó un 63% de cromo (VI), estas fueron la que mejor degradación realizaron. En cambio, la bacteria B (*Enterobacter cloacae*) degradó sólo un 37% y la bacteria D (*Pseudomona aeruginosa*) degradó sólo un 22% de cromo (VI). Concluyendo que las bacterias son resistentes a cromo pero solo 3 de ellas degradan un buen porcentaje.



## RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una identificación molecular para resultados más exactos.
- Podría evaluar la capacidad degradativa de cromo de las bacterias aisladas frente a los mismos efluentes de curtiembre.
- La variación de toma de muestra a diferentes horas y de diferentes curtiembres, para ver si existe variación.
- Hacer investigaciones sobre el metabolismo de cada bacteria para determinar qué capacidad tienen las bacterias al degradar el cromo, es decir de qué forma lo hacen.





## BIBLIOGRAFÍA

1. Soni K. Environmental Science and Pollution Research. EEUU; 2013.
2. Richard Nixon. Environmental protection agency. Washington D.C; 2014.
3. Aguilar E. The chra homologue from a sulfure-regulated gene cluster in cyanobacterial plasmid panl confer chromate resistance; 2011.
4. Chai L. Remediation by indigenous bacteria in soils contaminated by chromium-containing slag. Journal of Hazardous Materials; 2009.
5. Ramon Mendez G. Producción limpia en la industria curtiembre. Madrid; 2007.
6. Panigatti MC. Biorremoción de efluentes de cromo (IV) provenientes de plantas metalmecánicas. Buenos Aires; 2014.
7. Porras A. Descripción de la nocividad del cromo proveniente de la industria curtiembre y de las posibles formas de removerlo. Medellín; 2010.
8. Esparza Eliana. Contaminación debida a la industria curtiembre. Santiago de Chile; 2001.
9. García M. Composición de aguas residuales. Lima; 2010.
10. Farías Paulo. Informe técnico sobre minimización de residuos en una curtiembre. Alemania; 2014.
11. Mishra C.S.K. Environmental biotechnology. Aph publishing corporation; 1998.
12. Alcarraz Mario. El efluente de Curtiembre; Reutilización de líquidos efluentes. Argentina; 1983.
13. Araujo L. Bioadsorción de cromo con borra de café en efluentes de una industria curtiembre local. Lima; 2016.
14. Lazo Cuentas E. Evaluación de la contaminación ambiental generada por efluentes industriales. Arequipa; 2017.
15. Barriga Montalvo G. Remocion de metales pesados de efluentes industriales del sector metal-mecanico utilizando un consorcio bacteriano nativo. Arequipa; 2015.
16. Taratamiento de aguas residuales de curtiembres en el Canton Cuenca mediantet EMAs. Cuenca, Ecuador; 2017

17. Atlas R.M. y Unterman R. Bioremediation. In: Demain AL & Davies JE (Eds). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology; 2000.
18. Focardi S. Microbial reduction of hexavalent chromium as a mechanism of detoxification and possible bioremediation applications. Biodegradation; 2013.
19. Moreira F. Microbiología e Bioquímica do Solo. Atual. E ampl. Lavras: Ufla; Sao Paulo; 2006.
20. Faddín M. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica; Ciudad de México; 2013.
21. Ochoa Carreño D. Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. Colombia; 2010.
22. Bustos Viteri K. Identificación molecular de bacterias resistentes a cadmio y cromo aisladas de aguas contaminadas de la zona de papallacta cantón quijos de la provincia de napo; 2017.
23. Cheunga G. Mechanism of Hexavalent Chromium Detoxification by Microorganisms and Bioremediation Application Potential: A Review; 200.
24. Col P. Cinética de un consorcio microbiano; 1999.
25. Mora Ventura M. Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria. Barcelona; 2017.
26. Jurado Gómez H. Cinética del crecimiento y determinacion de la fase de muerte en staphylococcus aureus cowan i bajo diferentes condiciones nutricionales. Colombia; 2011.
27. Tirado J. Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados; 2005.
28. Condori Y. Evaluación del comportamiento cinético del bifidobacterium bb12, y la influencia del ph y acidez en las características sensoriales del yogurt probiótico enriquecido con sucedáneo de leche de quinua (chenopodium quinoa willd.); 2016.
29. Pérez Hernández V. Efecto del petroleo sobre microorganismos cultivables de la rizosfera de árboles tropicales; México; 2015.
30. Cruz Carrillo A. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de bidens pilosa, lantana camara, schinus molle y silybum marianum; Bogotá; 2010.

31. Horna Quintana G. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el instituto nacional de enfermedades neoplásicas. Lima; 2005.
32. Tamayo C. Técnicas e instrumentos de recolección de datos. Chimbote; 2014.
33. Collazos M. Aislamiento de microorganismos electrogénicos con potencial para reducir cromo hexavalente; 2015
34. Gram C. Identificación de bacterias; 1984.
35. Perilla M. Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. EE.UU;2010.
36. Jurado H. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición in vitro de Lactobacillus casei en Staphylococcus.
37. Duguarte Jiménez N. Determinación de la correlación entre métodos visuales, ópticos y difusión en placa en el crecimiento de escherichia coli. Ambato; 2017.
38. Rodríguez N. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de bidens pilosa, lantana camara. Colombia; 2017.
39. Nakayima A. Selective accumulation of heavy metals by microorganism. EE.UU; 2019.
40. Jaime Flores Vasquez. “bioremediación de metales tóxicos en efluentes. Arequipa; 2001.
41. Barrow F. Manual de identificación de pruebas bioquímicas.
42. Macfaddin. Pruebas Bioquímicas de Identificación de Bacterias; 2003.
43. Scott by. Diagnostico microbiológico; 2009.
44. Severiche C. Verificación analítica para las determinaciones de cromo hexavalente en aguas por espectrofotometría. Chile; 2013.
45. Sac H. Ranking de ventas por cliente, sistema soinfo. Lima; 2013.
47. S.k. A. Environmental biotechnology; 2000.
48. Otiniano García M. Capacity of chromium vi bioremediation from waste waters of tanneries by pseudomonas sp. 2013.
49. Morais L. Antimicrobial activity of extracts of Clematis vitalba towards pathogenic yeast and yeast-like microorganisms; 2000.
50. Miller S. Informe para el Ministerio de Industria y Turismo, Integración y Comercio nternacional (MITINCI). Lima; 2000.



51. Khanafari A. Removal of lead chromium from aqueous solution by *Bacillus circulans* Biofilm; EEUU; 2008.
52. Murugavelh S. Isolation, identification and characterization of cr(vi) reducing bacillus cereus from chromium contaminated soil. Chemical engineering. EEUU; 2013.
53. Das S. Study on soil physico-chemical, microbial and metal content in Sukinda chromite mine of Odisha, India. Environmental Earth Sciences. India; 2013.
54. Das S. Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. Chemosphere. India; 2014.
55. Dara Atilano S. Géneros bacterianos presentes en el efluente con anilina de una curtiembre del Distrito de Florencia de Mora. Trujillo (Perú); 2017.
56. Bachate S. Simultaneous reduction of Cr(VI) and oxidation of As(III) by *Bacillus firmus* TE7 isolated from tannery effluent. EEUU; 2013.
57. Ávila P. Heavy metal concentrations in water and bottom sediments of a Mexican reservoir. Sci. México; 1999.
58. Gobierno Municipalidad de Lima. Miles del Sector Curtiembre se capacitan en Gestión Ambiental rentable. Lima; 2018..
59. Porras A. Descripción de la nocividad del cromo proveniente de la industria curtiembre y de las posibles formas de removerlo; 2010.
60. Nies D. Microbial heavy-metal resistance. EEUU;1999.

### 3. ANEXOS

#### **Anexo 1. Composición del Medio Luria Bertani (A) y medio LB con cromo (B)**

| A) MEDIO LURIA BERTANI               |               |
|--------------------------------------|---------------|
| Componente                           | Gramos/ Litro |
| Peptona                              | 10            |
| Extracto de levadura                 | 5             |
| Cloruro de sodio                     | 10            |
| Agar                                 | 20            |
| B) MEDIO LB con Dicromato de potasio |               |
| Componente                           | Gramos/ Litro |
| Peptona                              | 10            |
| Extracto de levadura                 | 5             |
| Cloruro de sodio                     | 10            |
| Dicromato de potasio                 | 0.5           |
| Agar                                 | 20            |

## Anexo 2 Caracterización del efluente de la curtiembre PIRS

Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7

| ANALISIS       | RESULTADO     | LIMITE DE DETECCIÓN | LIMITE DE CUANTIFICACIÓN |
|----------------|---------------|---------------------|--------------------------|
| Aluminio (Al)  | 0,526         | 0,0014              | 0,0043                   |
| Arsénico (As)  | 0,030         | 0,0000              | 0,0000                   |
| Boro (B)       | 1,919         | 0,0024              | 0,0071                   |
| Cadmio (Cd)    | 0,001         | 0,0000              | 0,0000                   |
| Cromo (Cr)     | 19,280        | 0,0025              | 0,0076                   |
| Cobre (Cu)     | 0,022         | 0,0013              | 0,0038                   |
| Manganeso (Mn) | 0,080         | 0,0013              | 0,0038                   |
| Niquel (Ni)    | No detectable | 0,0015              | 0,0046                   |
| Plomo (Pb)     | No detectable | 0,0022              | 0,0066                   |
| Zinc (Zn)      | 0,193         | 0,0000              | 0,0000                   |

LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD  
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA P.P. FARMACIA Y BIOTECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA P.P. FARMACIA Y BIOTECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA P.P. FARMACIA Y BIOTECNOLOGÍA



### Anexo 3. Tablas de absorbancias del crecimiento microbiano

#### Bacteria A

| ABS    | CONCENTRACION<br>cel/ml | TIEMPO |
|--------|-------------------------|--------|
| 0.0200 | 3.00E+06                | 0      |
| 0.0220 | 3.00E+06                | 1      |
| 0.0227 | 3.00E+06                | 2      |
| 0.0230 | 3.00E+06                | 3      |
| 0.0243 | 3.00E+06                | 4      |
| 0.0247 | 3.00E+06                | 5      |
| 0.0253 | 3.00E+06                | 6      |
| 0.0263 | 9.78E+06                | 7      |
| 0.0273 | 1.19E+07                | 8      |
| 0.0287 | 1.42E+07                | 9      |
| 0.0300 | 1.80E+07                | 10     |
| 0.0310 | 2.13E+07                | 11     |
| 0.0333 | 2.51E+07                | 12     |
| 0.0367 | 3.02E+07                | 13     |
| 0.0370 | 3.64E+07                | 14     |
| 0.0400 | 4.13E+07                | 15     |
| 0.0420 | 4.80E+07                | 16     |
| 0.0445 | 6.44E+07                | 17     |
| 0.0450 | 6.99E+07                | 18     |
| 0.0452 | 7.06E+07                | 19     |
| 0.0452 | 7.08E+07                | 20     |

#### Bacteria B

| ABS    | CONCENTRACION<br>cel/ml | TIEMPO |
|--------|-------------------------|--------|
| 0.0203 | 3.00E+06                | 0      |
| 0.0207 | 3.01E+06                | 1      |
| 0.0210 | 3.20E+06                | 2      |
| 0.0217 | 3.22E+06                | 3      |
| 0.0227 | 3.23E+06                | 4      |
| 0.0233 | 3.30E+06                | 5      |
| 0.0237 | 3.44E+06                | 6      |
| 0.0247 | 3.54E+06                | 7      |
| 0.0253 | 5.78E+06                | 8      |
| 0.0260 | 7.11E+06                | 9      |
| 0.0272 | 8.00E+06                | 10     |
| 0.0280 | 1.06E+07                | 11     |
| 0.0293 | 1.33E+07                | 12     |
| 0.0323 | 1.62E+07                | 13     |
| 0.0326 | 1.96E+07                | 14     |
| 0.0352 | 2.46E+07                | 15     |
| 0.0370 | 2.93E+07                | 16     |
| 0.0392 | 3.60E+07                | 17     |
| 0.0396 | 4.66E+07                | 18     |
| 0.0398 | 5.19E+07                | 19     |
| 0.0398 | 5.25E+07                | 20     |

### Bacteria C

| ABS    | CONCENTRACION<br>cel/ml | TIEMPO |
|--------|-------------------------|--------|
| 0.0220 | 3.00E+06                | 0      |
| 0.0223 | 3.00E+06                | 1      |
| 0.0227 | 3.00E+06                | 2      |
| 0.0233 | 3.00E+06                | 3      |
| 0.0250 | 3.00E+06                | 4      |
| 0.0257 | 3.00E+06                | 5      |
| 0.0263 | 3.89E+06                | 6      |
| 0.0270 | 1.00E+07                | 7      |
| 0.0277 | 1.22E+07                | 8      |
| 0.0280 | 1.38E+07                | 9      |
| 0.0290 | 1.67E+07                | 10     |
| 0.0297 | 1.96E+07                | 11     |
| 0.0337 | 2.42E+07                | 12     |
| 0.0370 | 3.14E+07                | 13     |
| 0.0374 | 3.47E+07                | 14     |
| 0.0404 | 4.23E+07                | 15     |
| 0.0424 | 5.34E+07                | 16     |
| 0.0450 | 6.39E+07                | 17     |
| 0.0454 | 7.14E+07                | 18     |
| 0.0456 | 7.41E+07                | 19     |
| 0.0457 | 7.43E+07                | 20     |

### Bacteria D

| ABS    | CONCENTRACION<br>cel/ml | TIEMPO |
|--------|-------------------------|--------|
| 0.0213 | 3.00E+06                | 0      |
| 0.0217 | 3.00E+06                | 1      |
| 0.0223 | 3.00E+06                | 2      |
| 0.0230 | 3.00E+06                | 3      |
| 0.0237 | 3.00E+06                | 4      |
| 0.0247 | 3.00E+06                | 5      |
| 0.0253 | 4.22E+06                | 6      |
| 0.0263 | 8.53E+06                | 7      |
| 0.0270 | 1.09E+07                | 8      |
| 0.0287 | 1.42E+07                | 9      |
| 0.0293 | 1.78E+07                | 10     |
| 0.0313 | 1.96E+07                | 11     |
| 0.0387 | 2.44E+07                | 12     |
| 0.0425 | 2.82E+07                | 13     |
| 0.0430 | 4.26E+07                | 14     |
| 0.0464 | 4.91E+07                | 15     |
| 0.0487 | 6.24E+07                | 16     |
| 0.0516 | 8.21E+07                | 17     |
| 0.0522 | 8.98E+07                | 18     |
| 0.0524 | 9.27E+07                | 19     |
| 0.0525 | 9.29E+07                | 20     |

## Bacteria E

| ABS    | CONCENTRACION<br>cel/ml | TIEMPO |
|--------|-------------------------|--------|
| 0.0190 | 3.00E+06                | 0      |
| 0.0193 | 3.00E+06                | 1      |
| 0.0217 | 3.00E+06                | 2      |
| 0.0223 | 3.00E+06                | 3      |
| 0.0227 | 3.00E+06                | 4      |
| 0.0233 | 3.00E+06                | 5      |
| 0.0243 | 3.00E+06                | 6      |
| 0.0253 | 6.89E+06                | 7      |
| 0.0267 | 8.89E+06                | 8      |
| 0.0277 | 1.16E+07                | 9      |
| 0.0290 | 1.42E+07                | 10     |
| 0.0297 | 1.71E+07                | 11     |
| 0.0313 | 1.98E+07                | 12     |
| 0.0345 | 2.22E+07                | 13     |
| 0.0348 | 2.60E+07                | 14     |
| 0.0376 | 3.20E+07                | 15     |
| 0.0395 | 4.36E+07                | 16     |
| 0.0418 | 5.31E+07                | 17     |
| 0.0423 | 6.02E+07                | 18     |
| 0.0425 | 6.16E+07                | 19     |
| 0.0425 | 6.17E+07                | 20     |



#### **ANEXO 4. LEY GENERAL DE AGUAS: Decreto Ley N° 17752 (1969)**

LEY GENERAL DE AGUAS: Decreto Ley N° 17752 (1969)

TITULO II, DE LA CONSERVACION Y PRESERVACION DE LAS AGUAS

Capítulo II, De la Preservación

Artículo 22°.- Prohibiciones

Está prohibido verter o emitir cualquier residuo sólido, líquido o gaseoso que pueda contaminar las aguas, causando daños o poniendo en peligro la salud humana o el normal desarrollo de la flora o fauna o comprometiendo su empleo para con otros usos. Podrán descargarse únicamente cuando:

- a) Sean sometidos a los necesarios tratamientos previos
- b) Se compruebe que las condiciones del receptor permitan los procesos naturales de purificación
- c) Se compruebe que con su lanzamiento submarino no se causará perjuicio a otro uso
- d) En otros casos que autorice el Reglamento.

La Autoridad Sanitaria dictará las providencias y aplicará las medidas necesarias para el cumplimiento de la presente disposición. No obstante, la contaminación fuere inevitable, podrá llegar hasta la revocación del uso de las aguas o la prohibición o la restricción de la actividad dañina.

Artículo 23°.- Prohibición de vertimiento de residuos

Está prohibido verter a las redes públicas de alcantarillado, residuos con propiedades corrosivas o destructoras de los materiales de construcción que imposibiliten la reutilización de las aguas receptoras.

Artículo 24°.- Autoridad competente para el establecimiento de límites de concentración permisibles 114

La Autoridad Sanitaria establecerá los límites de concentración permisibles de sustancias nocivas, que pueden contener las aguas, según el uso a que sedestinen. Estos límites podrán ser revisados periódicamente.

Artículo 25°.- Suspensión del suministro de aguas. Cuando la Autoridad Sanitaria compruebe la contravención de las disposiciones contenidas en este Capítulo podrá solicitar a la Autoridad de Aguas Dirección General de Asuntos Ambientales Ministerio de Energía y Minas República del Perú la suspensión del suministro, mientras se realizan los estudios o trabajos que impidan la contaminación de las aguas.

**ANEXO 5** Estándares Nacionales Ambientales D.S. N° 002-2008-MINAM

**ANEXO 1**  
**ESTÁNDARES NACIONALES DE CALIDAD AMBIENTAL PARA AGUA**  
**CATEGORÍA 1: POBLACIONAL Y RECREACIONAL**

| PARÁMETRO          | UNIDAD | Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable |   |  |                   | Aguas superficiales destinadas para recreación |       |
|--------------------|--------|--|---|--|-------------------|--|-------|
|                    |        | A1   | A2  | A3   | B1                | B2   |       |
|                    |        | Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección            | Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional | Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamientos con tratamiento avanzado | Contacto Primario | Contacto Secundario                            | VALOR |
| <b>INORGÁNICOS</b> |        |  |   |  |                   |  |       |
| Aluminio           | mg/l   | 0,2  | 0,2   | 0,2  | 0,2               | 0,2  | **    |
| Antimonio          | mg/l   | 0,006  | 0,006   | 0,006  | 0,006             | 0,006  | **    |
| Arsénico           | mg/l   | 0,01   | 0,01  | 0,05   | 0,01              | 0,01   | **    |
| Bario              | mg/l   | 0,7  | 0,7   | 1  | 0,7               | 0,7  | **    |
| Berilio            | mg/l   | 0,004  | 0,04  | 0,04   | 0,04              | 0,04   | **    |
| Boro               | mg/l   | 0,5  | 0,5   | 0,75   | 0,5               | 0,5  | **    |
| Cadmio             | mg/l   | 0,003  | 0,003   | 0,01   | 0,01              | 0,01   | **    |
| Cobre              | mg/l   | 2  | 2   | 2  | 2                 | 2  | **    |
| Cromo Total        | mg/l   | 0,05   | 0,05  | 0,05   | 0,05              | 0,05   | **    |
| Cromo VI           | mg/l   | 0,05   | 0,05  | 0,05   | 0,05              | 0,05   | **    |
| Hierro             | mg/l   | 0,3  | 1   | 1  | 0,3               | 0,3  | **    |
| Manganeso          | mg/l   | 0,1  | 0,4   | 0,5  | 0,1               | 0,1  | **    |
| Mercurio           | mg/l   | 0,001  | 0,002   | 0,002  | 0,001             | 0,001  | **    |
| Níquel             | mg/l   | 0,02   | 0,025   | 0,025  | 0,02              | 0,02   | **    |
| Plata              | mg/l   | 0,01   | 0,05  | 0,05   | 0,01              | 0,01   | 0,05  |
| Plomo              | mg/l   | 0,01   | 0,05  | 0,05   | 0,01              | 0,01   | **    |
| Selenio            | mg/l   | 0,01   | 0,05  | 0,05   | 0,01              | 0,01   | **    |
| Uranio             | mg/l   | 0,02   | 0,02  | 0,02   | 0,02              | 0,02   | 0,02  |
| Vanadio            | mg/l   | 0,1  | 0,1   | 0,1  | 0,1               | 0,1  | 0,1   |
| Zinc               | mg/l   | 3  | 5   | 5  | 3                 | 3  | **    |

\*\* Se entenderá que para esta subcategoría, el parámetro no es relevante, salvo casos específicos que la Autoridad competente determine.