

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

“Factibilidad de Biosorción de Cromo (III y VI) en Aguas Residuales Industriales - ARI’s  
contaminadas utilizando microflora nativa aislada y caracterizada en su hábitat proveniente del  
Parque Industrial Rio Seco- PIRS Arequipa, Perú”

Tesis presentada por los bachilleres:

Diego Gabriel Prado Salinas

Fernanda Ruiz de Somocurcio Chávez Quiroz

Para obtener el título Profesional de Ingeniero  
Biotecnólogo

Asesor: Mgter. Francisco Javier Roque Rodríguez

AREQUIPA- PERU

2013

## DEDICATORIA

Quiero dedicarle este trabajo

A Dios, por mostrarme día a día que con humildad, paciencia y sabiduría, todo es posible.

A mis padres, por estar a mi lado cuando más los necesité; en especial a mi mamá por su gran compañía y permanente ayuda, así como por su constante aliento y motivación.

A mi hermano, por su apoyo incondicional; y a toda mi familia, muchos de los cuales, aun estando lejos, siempre supieron darme las palabras de aliento que necesitaba para seguir adelante.

Fernanda.

Quiero dedicar este trabajo

A Dios, que siempre está presente en mi vida y me guía en el camino del bien.

A Manolito, que desde el cielo me protege y me manda sabiduría para enfrentar los problemas.

A mis padres y hermanos por su amor, trabajo y constante exigencia para que no me rinda ante las adversidades.

Diego Gabriel



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### RESUMEN

### ABSTRACT

### INTRODUCCION

### CAPITULO I: GENERALIDADES

1.1 Formulación del problema.....	13
1.2 Hipótesis.....	14
1.3 Objetivos.....	15
Objetivo principal.....	15
Objetivos específicos.....	15
1.4 Variables de estudio.....	16
Variables Dependiente.....	16
Variables Independiente.....	16
1.5 Justificación.....	17

### CAPITULO II: MARCO TEORICO

2.1 Cromo, generalidades y estados de oxidación.....	18
2.2 Toxicidad y efectos en la salud.....	20
2.3 Cromo y sus aplicaciones.....	24

2.4 Legislación y límites permisibles .....	25
2.5 Métodos convencionales de remoción de Cromo .....	26
2.6 Métodos biotecnológicos de remoción de Cromo .....	30
2.7 Diseño de sistemas para la remediación de aguas residuales contaminadas con Cromo .....	37
2.8 Perspectivas futuras .....	38

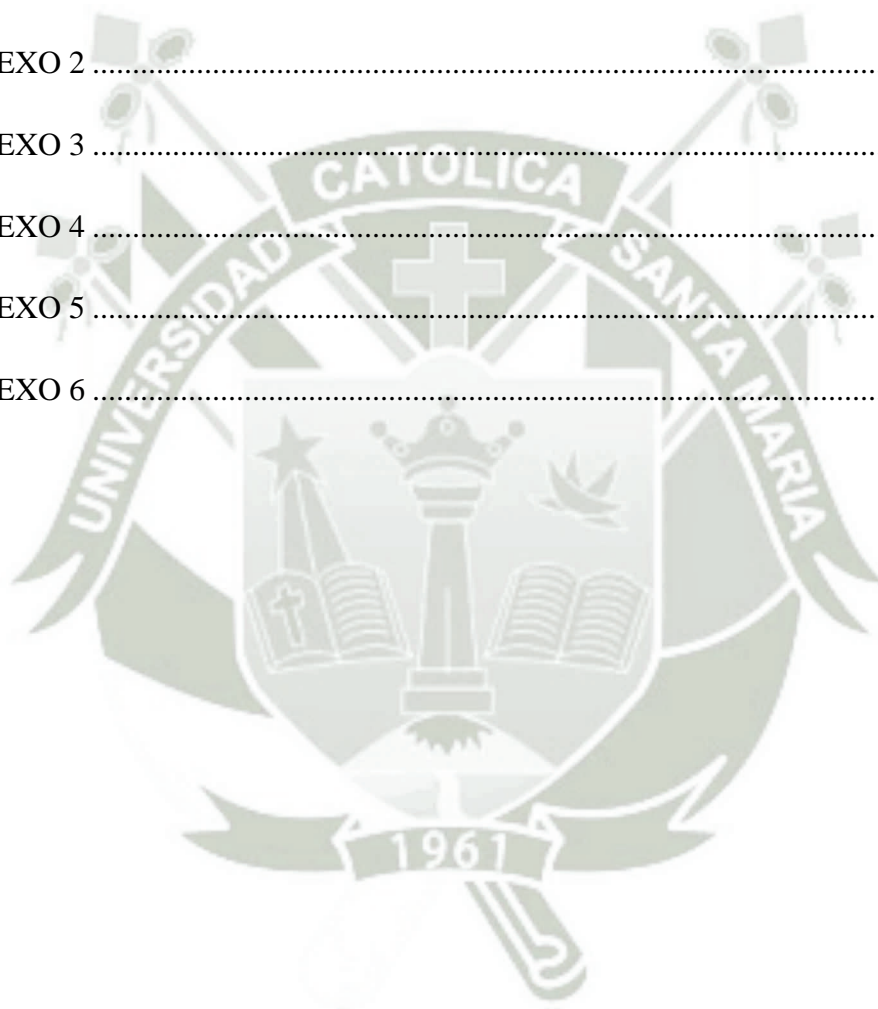
### **CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1 Campo de investigación.....	39
3.2 Materiales .....	39
3.3 Metodología.....	41

### **CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1 Recolección de la muestra .....	62
4.2 Aislamiento de la microflora nativa .....	63
4.3 Caracterización bioquímica y morfológica de las especies microbiológicas aisladas .....	64
4.4 Evaluación de la biosorción de cromo (III y VI ) en aguas sintéticas .....	80
4.5 Evaluación de la bioabsorción de cromo (III y VI) en aguas residuales con el consorcio microbiano de mejor desempeño .....	94
4.6 Aplicación a escala del consorcio microbiano en la bioremediación virtual de ARI's del PIRS .....	98

<b>CONCLUSIONES</b> .....	100
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	102
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	103
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO 1 .....	110
ANEXO 2 .....	112
ANEXO 3 .....	113
ANEXO 4 .....	115
ANEXO 5 .....	121
ANEXO 6 .....	136



## ABREVIATURAS

**a:** Intercepto de la regresión lineal simple

**Abs:** Absorbancia

**ANOVA:** análisis de varianza

**ARIS:** Aguas Residuales industriales

**b:** Ordenada al origen

**CAR:** Concentración de Cromo en el agua residual

**CAS:** Concentración de Cromo en aguas sintéticas

**M:** molaridad

**N:** normalidad

**P:** Muestras profundas de agua residual

**PC:** Medio de cultivo Plate Count

**PIRS:** Parque Industrial Rio Seco

**S:** Muestras superficiales de agua residual

**Sbl:** Desviación Estándar de la absorbancia a la concentración cero

**STD:** solución estándar

**TSI:** Agar Triple azúcar hierro

**TPS:** Temperatura y presión estándar

**y:** Absorbancia

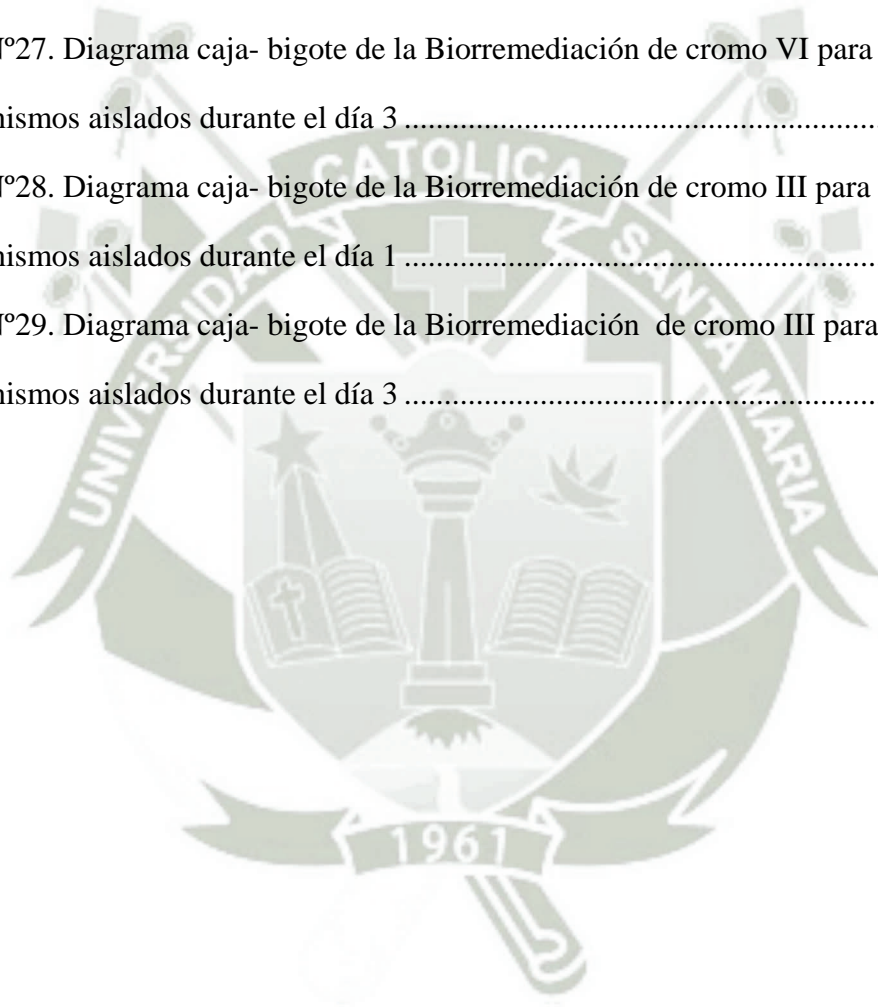
**Ybl:** absorbancia a concentración cero

**YPD:** Medio de Cultivo Yeast Peptone Dextrose

## ÍNDICE DE FIGURAS

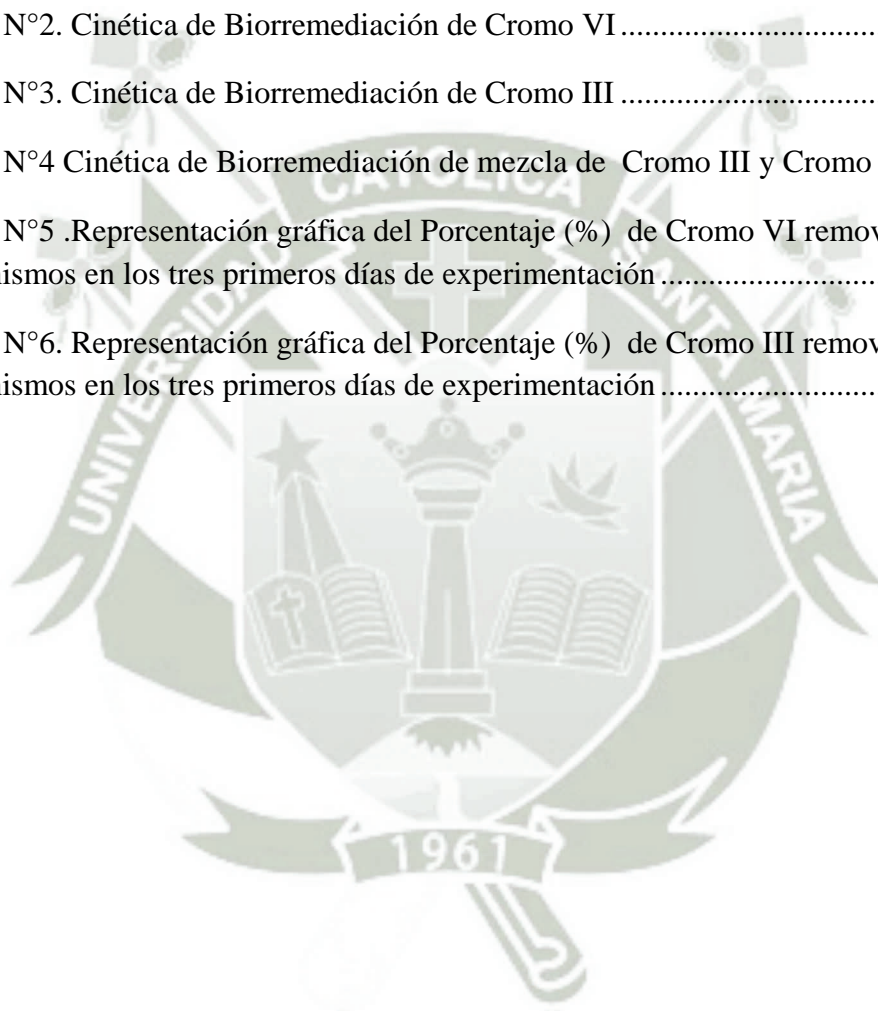
FIGURA N° 1 Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos .....	33
FIGURA N°2. Esquema de inmovilización de biomasa y unión a iones metálicos.....	38
FIGURA N°3. Representación gráfica de la toma de muestras en la laguna del Parque Industrial de Rio Seco .....	42
FIGURA N°4. Sistema diseñado para el aislamiento de algas.....	45
FIGURA N°5. Sistema diseñado para la adaptación de las especies microbiológicas .....	53
FIGURA N°6. Propuesta de sistema de Biorremediación de Cromo.....	55
FIGURA N°7. Reacción química del Cromo VI con la 1,5-difenilcarbazida .....	56
FIGURA N°8. Celda virtual utilizada para la simulación de cambio de escala .....	60
FIGURA N°9. Vista panorámica de la laguna de oxidación del Parque Industrial de Rio Seco Arequipa .....	62
FIGURA N° 10. Características morfológicas de las cepas nativas.....	63
FIGURA N° 11. Coloración de GRAM de las cepas nativas aisladas .....	65
FIGURA N° 12. Ilustración de la prueba de la catalasa.....	66
FIGURA N° 13. Ilustración de la prueba positiva de la coagulasa .....	66
FIGURA N° 14. Ilustración de la prueba de la oxidasa .....	67
FIGURA N° 15. Ilustración de la prueba de la oxidasa .....	67
FIGURA N° 16. Resultados de la prueba del TSI.....	68
FIGURA N° 17. Resultados de la prueba de LIA .....	68
FIGURA N° 18 Resultados de la prueba de la Ornitina.....	68
FIGURA N° 19. Resultados de la prueba del Rojo de Metilo.....	69
FIGURA N°20. Resultados de la prueba del Voges Proskauer.....	69
FIGURA N°21. Vista al microscopio de los microorganismos acido resistentes .....	70

FIGURA N°22. Equipo diseñado para la adaptación de las especies microbiológicas.....	80
FIGURA N°23. Sistema de Biorremediación de cromo para aguas residuales .....	86
FIGURA N°24 Muestras de agua residual cruda y bajo tratamiento .....	94
FIGURA N°25. Acción biodepuradora del Corynebacterium en las aguas del PIRS.....	99
FIGURA N°26. Diagrama caja-bigote de la Biorremediación de cromo VI para los Microorganismos aislados durante el día 1 .....	125
FIGURA N°27. Diagrama caja- bigote de la Biorremediación de cromo VI para los Microorganismos aislados durante el día 3 .....	129
FIGURA N°28. Diagrama caja- bigote de la Biorremediación de cromo III para los Microorganismos aislados durante el día 1 .....	132
FIGURA N°29. Diagrama caja- bigote de la Biorremediación de cromo III para los Microorganismos aislados durante el día 3 .....	136



## ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRAFICA N°1. Curva de Calibración para la determinación de los límites de detección y Cuantificación de Cromo Hexavalente.....	83
GRAFICA N°2. Cinética de Biorremediación de Cromo VI.....	87
GRAFICA N°3. Cinética de Biorremediación de Cromo III.....	88
GRÁFICA N°4 Cinética de Biorremediación de mezcla de Cromo III y Cromo VI.....	90
GRÁFICA N°5 .Representación gráfica del Porcentaje (%) de Cromo VI removido por los microorganismos en los tres primeros días de experimentación.....	91
GRÁFICA N°6. Representación gráfica del Porcentaje (%) de Cromo III removido por los microorganismos en los tres primeros días de experimentación.....	92



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Variables independientes .....	16
Tabla N°2. Variables dependientes .....	16
Tabla N°3. Principales compuestos del cromo.....	19
Tabla N°4. Propiedades fisicoquímicas del Cromo.....	20
Tabla N°5 Concentraciones y tiempo de exposición seguros para el Cromo.....	25
Tabla N° 6 Codificación de las muestras recolectadas.....	43
Tabla N°7 Reactivos utilizados en la curva de calibración .....	56
Tabla N°8 Reactivos utilizados en la determinación de Cromo Trivalente .....	58
Tabla N° 9. Características fisicoquímicas del agua residual.....	62
Tabla N° 10. Caracterización microscópica de las cepas nativas aisladas .....	66
Tabla N°11. Tabla resumen de identificación de los microorganismos aislados .....	77
Tabla N°12. Resumen de las principales pruebas bioquímicas para la identificación de las especies microbiológicas aisladas .....	78
Tabla N°13. Morfología e Identificación de cepas fungales aisladas .....	79
Tabla N°14. Resultados de la concentración inhibitoria de Cromo VI para cada una de las cepas aisladas .....	81
Tabla N°15. Resultados de la concentración inhibitoria de Cromo III para cada una de las cepas aisladas .....	82
Tabla N°16 Datos para la cuantificación de Cromo Hexavalente .....	83
Tabla N°17. Parámetros establecidos en el proceso de biorremediación.....	85
Tabla N°18. Promedio de las concentraciones de Cromo VI y Cromo III.....	89
Tabla N°19. Datos de la experimentación con el multiparámetro.....	95

Tabla N°20. Resultados iniciales y finales del tratamiento con los microorganismos seleccionados .....	96
--	----

**ANEXOS**

Tabla N°21. Datos de concentración de Cromo VI obtenidos de la Biosorción por los microorganismos aislados .....	110
Tabla N°22 Datos de concentración de Cromo III obtenidos de la Biosorción por los microorganismos aislados .....	111
Tabla N°23. Cálculos para determinar los volúmenes con los cuales se prepararon las soluciones de Cromo Hexavalente de la curva de calibración .....	112
Tabla N°24. Galería de fotos de la morfología de las cepas aisladas .....	113
Tabla N°25 Biorremediación de Cromo VI mediante los microorganismos aislados durante el Día 1 $\pm$ la desviación estándar de cada una de ellas (n=3) .....	122
Tabla N°26 ANOVA de la Biorremoción de Cromo VI resultantes de la experimentación realizada con los microorganismos aislados durante el Día 1 .....	122
Tabla N°27 HSD de Tukey <sup>a</sup> para las concentraciones de Cromo VI en el Día 1 .....	123
Tabla N°28 Agrupación de acuerdo HDS Tukey para los microorganismos encargados de la Biorremoción de Cromo VI durante el Día 1 .....	124
Tabla N°29. Biorremoción de Cromo VI mediante los microorganismos aislados durante el Día 3 $\pm$ desviación estándar de cada una de ellas (n=3) .....	126
Tabla N°30. ANOVA de la Biorremoción Cromo VI realizada por los microorganismos aislados durante el Día 3 .....	126
Tabla N°31 HSD de Tukey <sup>a</sup> para las concentraciones de Cromo VI en el Día 3 .....	127
Tabla N°32. Agrupación de acuerdo HDS Tukey para los microorganismos encargados de la Biorremoción de Cromo VI durante el Día 3 .....	128
Tabla N°33. Biorremoción de Cromo III mediante los microorganismos aislados durante el Día 1 $\pm$ desviación estándar de cada una de ellas (n=3) .....	130
Tabla N°34. ANOVA de la Biorremoción Cromo III realizada por los microorganismos aislados durante el Día 1 .....	130
Tabla N°35 HSD de Tukey <sup>a</sup> para las concentraciones de Cromo III en el Día 1 .....	131

Tabla N°36 Agrupación de acuerdo HDS Tukey para los microorganismos encargados de la Biorremoción de Cromo III durante el Día 1 .....	131
Tabla N°37. Biorremoción de Cromo III mediante los microorganismos aislados durante el Día 3 $\pm$ desviación estándar de cada una de ellas (n=3).....	133
Tabla N°38. ANOVA de la Biorremoción Cromo III realizada por los microorganismos aislados durante el Día 3.....	134
Tabla N°39. HSD de Tukey <sup>a</sup> para las concentraciones de Cromo III en el Día 3 .....	134
Tabla N°40 Agrupación de acuerdo HDS Tukey para los microorganismos encargados de la Biorremoción de Cromo III durante el Día 3 .....	135



## RESUMEN

Como es de conocimiento público, el vertido de agua residual con gran contenido de cromo procedente principalmente de curtiembres, es un peligro potencial para el medio ambiente y en especial para la población.

En esta investigación se buscó depurar las aguas residuales industriales altamente contaminadas con Cromo (III y VI) del Parque Industrial de Río Seco - (PIRS) de la ciudad de Arequipa utilizando la microflora nativa aislada de la misma fuente. Se aislaron 6 cepas bacterianas en medio Plate Count suplementado con Cr (100µg/ml), antibióticos (Amoxicilina, Dicloxacilina, Gentamicina, Cloranfenicol) y Antifúngicos (Anfotericina B). Se utilizaron pruebas bioquímicas y morfológicas para la identificación de estos microorganismos los cuales se reconocieron como: *Streptococcus grupo D*, *Kingella spp*, *Arizona spp*, *Klebsiella spp*, *Staphylococcus capitis*, *Corynebacterium aquaticus*. Los microorganismos aislados fueron sometidos a adaptación en agua residual con sales de Cromo III y VI, ambos a 20 ppm durante 15 días a 32°C, así como también a altas concentraciones de Cromo VI y Cromo III para determinar la concentración de inhibición de éstos, habiéndose determinado que para el Cromo VI la concentración de inhibición es de 500mg/L por el microorganismo *Streptococcus spp*. y para el Cromo III la concentración de inhibición es de 0.025 g/ml por los microorganismos *Streptococcus spp*.y *Kingella*. Se hizo además una determinación de la degradación de Cr III y Cr VI con la técnica de la difenilcarbazida en aguas sintéticas, utilizando Sulfato básico de cromo III y Dicromato de Potasio como reactivos, siendo los microorganismos con mejor desempeño el *Streptococcus* y

*Corynebacterium aquaticus*, los cuales lograron depurar un 44.42% y 40.47 % respectivamente del Cromo VI en solución en 3 días, mientras que para el Cromo III se logró obtener una depuración mayor al 65% para todos los microorganismos. Los dos microorganismos mencionados anteriormente fueron seleccionados y utilizados para la simulación en la laguna de oxidación del Parque Industrial Rio Seco- (PIRS) con 30 L de agua residual. Los resultados mostraron una reducción de Cromo Total en un periodo de 5 días de 5.3730mg/ L a 0.313 mg/L por *Corynebacterium aquaticus* y 0.298 mg/l por *Streptococcus*; así como también una reducción de Cromo VI de 2.24 mg/l a 0.72 mg/L por *Corynebacterium aquaticus* y 1.12 mg/L por *Streptococcus*; también se observó que hubo una depuración de distintos metales, como Zinc y Plomo, entre otros, presentes en el agua residual del Parque Industrial Rio Seco- (PIRS). Finalmente se realizó una simulación virtual de los resultados obtenidos para proyectar la factibilidad de la investigación a una escala real.

Por último, se concluye que el sistema utilizado puede considerarse factible para el tratamiento de aguas residuales de curtiembres y ser aplicado para el Parque Industrial de Rio Seco de la ciudad de Arequipa.

**Palabras clave:** Cromo III, Cromo VI, concentración , *Streptococcus spp.* , *Corynebacterium aquaticus*, Parque Industrial,

## ABSTRACT

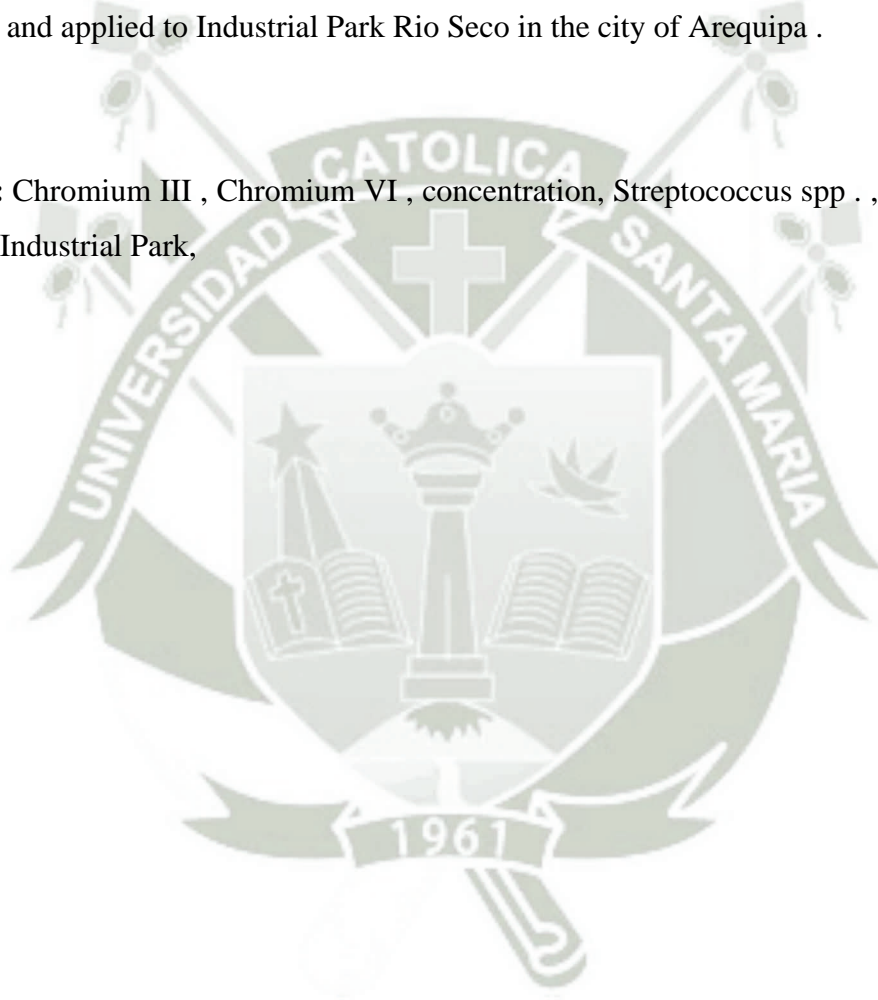
As is public knowledge, the discharge of wastewater with high chromium content mainly from tanneries, it is a potential danger to the environment and especially for the population.

This study aimed to purify industrial waste water highly contaminated with chromium (III and VI) from Industrial Park Rio Seco - ( PIRS ) of the city of Arequipa using native microflora isolated from the same source . Bacterial strains were isolated in Plate Count agar from the source and supplemented with Cr ( 100µg/ml ), antibiotics ( amoxicillin , dicloxacillin , Gentamicin , Chloramphenicol ) and antifungals ( amphotericin B ) . Morphological and biochemical tests were used for the identification of these organisms which are recognized as: *Streptococcus group D* , *Kingella spp* , *Arizona spp* , *Klebsiella spp* , *Staphylococcus capitis* , *Corynebacterium aquaticus* . The isolated microorganisms were subjected to adaptation in wastewater with salts of chromium III and VI , both at 20 ppm for 15 days at 32 ° C, as well as high concentrations of chromium (VI and III) to determine the inhibitory concentration of these , having determined that for Chromium VI inhibition concentration is 500mg / L by the microorganism *Streptococcus spp.* and Chromium III inhibition concentration is 0.025 g / ml for the microorganisms *Streptococcus spp. and Kingella* . Furthermore a determination of the degradation of Cr VI to Cr III was made with diphenylcarbazide technique using synthetic waters and basic chromium III sulfate and potassium dichromate as reagents , where the microorganisms with improved performance *Streptococcus* and *Corynebacterium aquaticus* , the which managed to debug a 44.42 % and 40.47 % respectively of Chromium VI in solution in three days , while for Chromium III managed to get a clearance greater than 65 % for all microorganisms . The two above-mentioned microorganisms were selected and used for the simulation in the oxidation pond Industrial Park

Rio Seco - ( PIRS ) with 30 L of wastewater. The results showed a reduction in Total Chromium a period of 5 days 5.3730mg / L to 0.313 mg / L for *Corynebacterium aquaticus* and 0.298 mg / l *Streptococcus*, as well as a reduction of chromium VI 2.24 mg / L 0.72 mg / L by *Corynebacterium aquaticus* and 1.12 mg / L for *Streptococcus* , also found that there was a purge of different metals such as zinc and lead , among others , present at the waste water Industrial Park Rio Seco. Finally there was a virtual simulation of the results to project the feasibility of a full-scale investigation .

Finally , we conclude that the system used can be considered feasible for the treatment of tannery wastewater and applied to Industrial Park Rio Seco in the city of Arequipa .

**Keywords:** Chromium III , Chromium VI , concentration, *Streptococcus* spp . , *Corynebacterium aquaticus* , Industrial Park,



## INTRODUCCIÓN

La contaminación causada por metales pesados en aguas superficiales ha sido siempre un problema muy grave, ya que estos elementos no son biodegradables y se acumulan en los tejidos vivos. El cromo es ampliamente utilizado en diversas aplicaciones industriales como la producción de acero, galvanoplastia, curtido de pieles, industrias textil, de conservación de la madera, de aluminio anodizado y refrigeración por agua <sup>(57)</sup>. La mayor cantidad del cromo en el medio ambiente se encuentra en la forma de cromo (III). Sin embargo se encuentran altas concentraciones de cromo (VI) como resultado de procesos industriales en la minería, curtido de cueros y galvanoplastia entre otros. <sup>(58)</sup>.

El cromo (VI) es altamente soluble en toda condición de pH lo cual lo hace muy móvil en los ecosistemas, además de ser extremadamente tóxico y carcinógeno (grupo A EPA). El cromo (III) en cambio es menos tóxico y no suele estar biodisponible ya que forma óxidos e hidróxidos insolubles. Los tratamientos fisicoquímicos tradicionales de efluentes conteniendo estos metales consisten en el ajuste del pH, reducción química, seguida de coagulación y floculación. En los últimos años, se han comenzado a estudiar, como alternativa, una serie de métodos biológicos utilizando microorganismos. <sup>(66)</sup> Muchos microorganismos son conocidos por ser capaces de concentrar especies de metales de soluciones acuosas diluidas y de acumularlas dentro de su estructura celular. Estos microorganismos incluyen levaduras, hongos, algas y bacterias. <sup>(59)</sup>

Los dos procesos más importantes involucrados en el tratamiento biológico de metales, son la adsorción en microorganismos o plantas (Biosorción) y la reducción de iones metálicos de un estado de valencia superior a una inferior (biorreducción), a través de reacciones enzimáticas o indirectamente con el metabolito producido. <sup>(54, 67, 68, 69, 70)</sup>. En particular, la reducción biológica de Cromo en cualquiera de sus formas (VI y III) permite considerar a los microorganismos como una herramienta biotecnológica para el tratamiento de las aguas residuales contaminadas con sales de cromo. En el presente trabajo de investigación se pretende depurar las aguas residuales industriales contaminadas con Cromo (III y VI) del Parque Industrial Rio Seco – (PIRS) utilizando un método biológico con microorganismos aislados de su misma fuente.

## CAPITULO I

### GENERALIDADES

#### 1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

El cromo es un metal pesado, que en su máximo estado de oxidación es carcinogénico. Es así como el poder oxidante del cromo de gran utilidad sintética, lo convierte simultáneamente a un elemento peligroso o biológicamente degradante, cuyo efecto depende en cierto modo de la naturaleza del material que lo contiene. La contaminación de aguas de uso industriales y principalmente provenientes de curtido que son vertidas en las vertientes de muchas ciudades ha llevado a idear soluciones siendo las de remediación biológicas las que muestran un resultado alentador. <sup>(60)</sup>

En la ciudad de Arequipa, el PIRS ( 16°21'46.42" S - 71°36'15.42" O, Google Earth®) tiene una tubería de desagüe de aproximadamente 30 a 40 cm de diámetro que conduce hacia una laguna de oxidación ubicada casi a 2 kilómetros de la curtiembre más cercana.

Dado que los talleres de curtiembres no realizan un tratamiento de sus residuos por no contar en sus instalaciones con plantas de tratamiento de efluentes ni reciclaje, ocasionó que la laguna de oxidación colmatara y dejara de funcionar. Actualmente alrededor de 150 empresas vierten a la quebrada de un promedio de 300 litros de aguas residuales por segundo ocasionando la contaminación del suelo de las canteras de sillar y por percolación la contaminación de la napa freática y su posterior alcance a asentamientos humanos al igual que zonas agrícolas aledañas. Además de los malos olores como consecuencia de inadecuadas o inexistentes plantas de pre-tratamiento en las curtiembres, afectando la calidad del aire.

Es importante tomar en cuenta los efectos nocivos para la salud que pueden traer estas sustancias e implementar tecnología que permita disminuir los efectos de los efluentes en la población. Así mismo, se propone utilizar la transferencia tecnológica al Consorcio del Parque Industrial Rio Seco – (PIRS).

## 1.2 HIPÓTESIS

Dado que los efluentes industriales procedentes del Parque Industrial de Rio Seco– (PIRS) de la ciudad de Arequipa, contienen alta contaminación en metales pesados, principalmente en Cromo (III y VI) debido a sus procesos industriales (curtiembres), es posible utilizar su propia microflora microbiana adaptada a este hábitat para su depuración parcial y/o total y conseguir eliminar los efluentes de este tipo de contaminante.



### 1.3 OBJETIVOS:

#### GENERAL:

Determinar la factibilidad de biosorción de Cromo (III y VI) en Aguas Residuales Industriales contaminadas utilizando microflora nativa aislada y caracterizada en su hábitat proveniente del Parque Industrial Rio Seco- PIRS de la ciudad de Arequipa, Perú.

#### ESPECÍFICOS:

1. Aislar y caracterizar la microflora nativa procedente de aguas residuales del Parque Industrial Rio Seco- PIRS
2. Evaluar la Biosorción de Cromo ( III y VI) en Aguas sintéticas por la microflora nativa aislada
3. Evaluar la Biosorción de Cromo (III y VI) en Aguas residuales con el consorcio microbiano de mejor desempeño.
4. Ejecutar una simulación virtual para obtener un cambio de escala similar a la situación real con el consorcio microbiano de mejor desempeño.

#### 1.4 VARIABLES DE ESTUDIO:

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

**Tabla N°1.**

Variables independientes

Variable	Abreviatura	Indicador*
Muestras de agua residual	S ; P	S: 1, 2, 3, 4 P: 1, 2, 3, 4
Concentración de Dicromato de potasio, ppm		5, 50, 150, 250, 500
Concentración de Sulfato de Cromo III, mg/ l		13,14,15,20,25,50,90
Tiempo	t	Días

\*S = Superficiales, P = Profundas

**Tabla N°2.**

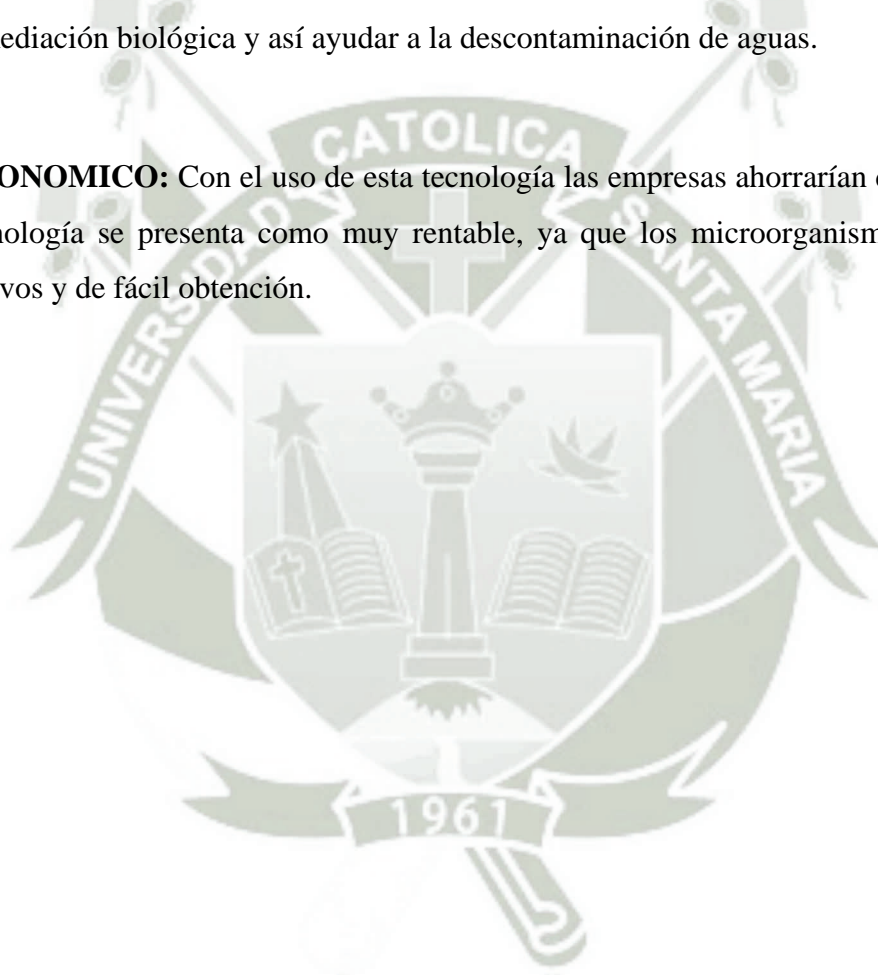
Variables dependientes

Variable	Abreviatura*	Indicador
Cepas bacterianas	B	Superficiales: S <sub>i</sub> B <sub>j</sub> Profundas: ; P <sub>j</sub> B <sub>j</sub>
Cepas Fungales	H	Superficiales: S <sub>i</sub> H <sub>j</sub> Profundas: S <sub>i</sub> H <sub>j</sub>
Concentración de Cromo en aguas sintéticas	CAS	Cromo III Cromo VI Cromo total
Concentración de Cromo en el agua residual	CAR	Cromo III Cromo VI Cromo total

\*B= Bacteria, H= Hongo, CAS= Concentración de Cromo en aguas sintéticas , CAR = Concentración de Cromo en el agua residual

### 1.5 JUSTIFICACIÓN:

- **AMBIENTAL:** La remediación biológica de Cromo (III y VI) promete ser muy alentadora, ya que presenta una solución sin ningún impacto ambiental y además de ser eficiente.
- **SOCIAL:** Con los resultados obtenidos se puede lograr en un futuro la implementación de esta tecnología en nuestra ciudad, siendo una de las primeras en innovar en la remediación biológica y así ayudar a la descontaminación de aguas.
- **ECONOMICO:** Con el uso de esta tecnología las empresas ahorrarían dinero ya que esta tecnología se presenta como muy rentable, ya que los microorganismos utilizados son nativos y de fácil obtención.



## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### **2.1 Cromo, generalidades y estados de oxidación:**

El cromo es un elemento químico de aspecto plateado metálico en su forma natural, es sólido y pertenece al grupo de los metales de transición. Su número atómico es 24 y su símbolo químico es Cr. El nombre Cromo proviene de la palabra griega “chroma” que significa color. Es un metal de color blanco, azulado, duro y quebradizo. Este elemento tiene un punto de fusión de  $21,3^{\circ}\text{K}$  o de  $1856,85^{\circ}\text{C}$ . El punto de ebullición del cromo es de  $29,5^{\circ}\text{K}$  o de  $2671,85^{\circ}\text{C}$ .<sup>(1)</sup> Las demás propiedades fisicoquímicas se detallan en la Tabla N°4. El cromo es el sexto elemento en abundancia en la corteza terrestre, en donde se encuentra como óxido ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) y, combinado con fierro y oxígeno, en el mineral cromita. Los metales de transición, es el grupo al que pertenece el cromo. En este grupo de elementos químicos, se encuentran aquellos situados en la parte central de la tabla periódica, concretamente en el bloque d y presenta características como la de incluir en su configuración electrónica el orbital d, parcialmente lleno de electrones así como también estos tipos de metales son característicos por tener elevada dureza, puntos de ebullición y fusión elevados y ser buenos conductores de la electricidad y el calor.<sup>(1)</sup>

Tabla N°3.

Principales compuestos del cromo<sup>1</sup>

Principales estados de Oxidación <sup>2</sup>	Compuesto
Trivalente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Óxido crómico</li> <li>• Sulfato crómico</li> <li>• Sulfato Básico de Cromo</li> </ul>
Hexavalente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trióxido de cromo</li> <li>• Dicromato sódico</li> <li>• Dicromato potásico</li> <li>• Cromato de plomo</li> <li>• Cromato cálcico</li> <li>• Cromato de zinc</li> </ul>

1. Córdoba, D. (2006) Toxicología; 2. Los estados de oxidación del Cromo van desde 0 hasta +6, sus formas trivalentes y hexavalentes son las más importantes.

El cromo presenta tres valencias : II, III y VI. La toxicidad de los compuestos depende del estado de la valencia del metal. El II es inestable y pasa rápidamente a III o trivalente. El VI o hexavalente es el de mayor importancia ya que la toxicidad es mayormente asociada a este estado, sin embargo, han ocurrido casos fatales después de la ingestión de ambos tipos y la sensibilidad crónica en piel también se ha relacionado con la forma trivalente.<sup>(2,3)</sup> Los principales compuestos de cromo de los estados trivalentes y hexavalentes se encuentran detallados en la Tabla N°3. Los compuestos de cromo trivalente son relativamente insolubles, no corrosivos y se absorben menos por piel intacta. Los compuestos de cromo hexavalente son muy corrosivos y causan severas lesiones al contacto con piel y mucosas <sup>(2,3,4)</sup>. Los derivados de Cromo (III) son compuestos que usualmente predominan en el ambiente porque son los derivados más estables del metal. El más importante de ellos es el óxido crómico, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, que es muy estable, resistente a los ácidos y de alto punto de fusión. Se emplea como pigmento de nombre "verde de cromo". Los

derivados de cromo (III) pueden formar iones complejos, estables y coloridos. <sup>(6)</sup> Los derivados de cromo (VI) son, fundamentalmente, de los cromatos y dicromatos. Ambos grupos son agentes oxidantes enérgicos que en medio ácido, pasan a cromo (III). El dicromato de potasio se emplea mucho en la industria y en operaciones químicas. El dicromato sódico se emplea en el curtido de pieles, por que forma un compuesto insoluble con las proteínas del cuero. El cromato de plomo se usa como pigmento, con el nombre de "amarillo de cromo". <sup>(6,7)</sup>

**Tabla N°4.**

Propiedades fisicoquímicas del Cromo<sup>1</sup>

<b>PROPIEDADES</b>	
Densidad	7140 Kg/m <sup>3</sup>
Dureza	8.5 Mohr
Conductividad eléctrica	7.74x10 <sup>6</sup> S/mol
Conductividad térmica	93.7 W
Calor específico	450 J/Kg.K
Punto de fusión	21,30 °K
Entalpía de fusión	16.9 KJ/mol
Punto de ebullición	29,5 °K
Entalpía de vaporización	344.3 KJ/mol
Presión de vapor	990 Pa a 2130 °K
Velocidad de sonido	5940 m/s a 293.15 °K

1. Artículo de la Enciclopedia Libre Universal en Español, 2008

## ***2.2 Toxicidad y efectos en la salud***

El cromo puede entrar al organismo humano por inhalación, ingestión y, en mucho menor medida, por absorción a través de la piel. En el caso de los trabajadores, las más importantes de

estas vías son la inhalación y el contacto dérmico, mientras que, para la población general, la vía más importante es la oral.

El cromo puede absorberse por vía respiratorio cuando se inhala aire que lo contiene. En el caso del cromo metálico, sus partículas se pueden depositar en el pulmones, si esto ocurre en la parte superior del aparato respiratorio, lo común es que las partículas salgan con la tos o sean tragadas. Si, en cambio, las partículas penetran al fondo de los pulmones, pueden permanecer tiempo suficiente para ser absorbidas y pasar a la sangre. No se ha calculado qué porcentaje del cromo que es inhalado se absorbe a través de los pulmones, pero los datos de experimentos con animales indican que, si la solubilidad es igual, los compuestos de cromo (VI) se absorben más rápidamente que los de cromo (III).<sup>(6)</sup>

Situaciones de gravedad que han puesto en peligro la vida del paciente han ocurrido con la ingestión de dosis tan pequeñas como 500 mg. De compuestos hexavalentes y aún casos fatales, con muerte en pacientes que han sufrido quemaduras después de 10% de superficie corporal comprometida. Por vía inhalatoria se ha causado edema pulmonar que ha llevado a la muerte cuando el compromiso pulmonar es severo.<sup>(5)</sup>

La absorción del cromo por vía digestiva ocurre como resultado de la ingestión de alimentos o agua que contengan derivados del metal. En el tracto gastrointestinal de los humanos y los animales, se absorbe menos de 1% de cromo (III) y alrededor de 10% del cromo (VI). La forma química, la solubilidad en agua y el tiempo de permanencia en el tracto gastrointestinal modifican la velocidad de absorción. El cromo (III) que se encuentra en los alimentos puede unirse a otros compuestos que facilitan su absorción a partir del estómago y los intestinos. En cuanto al cromo (VI), una vez que se ha absorbido, se transforma rápidamente en cromo (III). Normalmente el cromo no se absorbe a través de la piel, sin embargo, algunos estudios con poblaciones expuestas ocupacionalmente parecen indicar que es posible la absorción de algunos compuestos de cromo (VI) a través de la piel intacta.<sup>(6)</sup>

La distribución depósito es de suma importancia en lo que refiere a la toxicidad de los compuestos con Cromo ya que una pequeña fracción de cromo que se absorbe en el intestino pasa a la sangre, de donde se distribuye a los diferentes órganos. Una vez que ha sido absorbido, el cromo (III) no pasa fácilmente las membranas celulares, sino que se une a la transferrina - una proteína del plasma, que transporta hierro. En contraste, después de la absorción, el cromo (VI)

pasa rápidamente a los eritrocitos en donde se convierte en cromo (III). Independientemente de su origen, esto es, si se absorbió como tal, o es producto de la reducción del cromo (VI), el cromo (III) está ampliamente distribuido en el organismo y representa la mayor parte del cromo en el plasma y los tejidos. Sin embargo las dosis son muy pequeñas y si existe una sobreexposición resulta tóxica para el ser humano. El complejo proteínico del cromo (III) se deposita principalmente en médula ósea, pulmones, ganglios linfáticos, bazo, riñones e hígado.

La excreción de cromo ocurre principalmente a través de la orina y no hay una retención importante en los órganos. En los seres humanos, el riñón excreta aproximadamente el 60% del cromo (VI) que se haya absorbido, en las 8 horas siguientes a la absorción, en forma de cromo (III). Alrededor del 10% de la dosis de cromo absorbido se elimina mediante excreción biliar y cantidades menores se eliminan con el cabello, las unas, la leche y el sudor. En cuanto al cromo que fue ingerido con el agua y los alimentos, la mayor parte nunca se absorbe y se elimina con las heces después de unos días.

Los efectos adversos del cromo para la salud dependen, sobre todo, de los estados de valencia en el momento de la exposición y de la solubilidad del compuesto de que se trate. Las únicas formas de importancia toxicológica son el cromo (VI) y el cromo (III).

Los compuestos de cromo (VI), que son fuertes agentes oxidantes; tienden a ser irritantes y corrosivos y también son considerablemente más tóxicos que los compuestos de cromo (III), si las dosis y la solubilidad son similares. Se ha postulado que la diferencia en la toxicidad puede estar relacionada con la facilidad con la que el cromo (VI) atraviesa las membranas celulares y con su subsecuente reducción intracelular a intermediarios reactivos. El Cromo (III) es un nutriente esencial para el metabolismo de azúcares y grasas; aunque su función no está totalmente definida, aparentemente potencia la acción de la insulina, como parte del factor de tolerancia de la glucosa. La deficiencia de cromo en la dieta es poco frecuente, la mayoría de los casos se observan en personas desnutridas o diabéticas. Sin embargo, la exposición prolongada a cantidades excesivas de cromo (III) puede causar problemas de salud, entre ellos, se puede desarrollar una sensibilidad al cromo que causa enrojecimiento de la piel y lesiones en ésta. En la mayoría de los individuos, la inhalación de cromo (III) no causa irritación de nariz y boca.<sup>(8)</sup>

Los efectos tóxicos de la exposición al cromo (VI) han sido bien descritos en la literatura. En los ojos expuestos de manera crónica a derivados de cromo (VI) se observan conjuntivitis, lagrimeo

y dolor. El ácido crómico y sus sales son corrosivos para la piel y las membranas mucosas. Las lesiones aparecen en partes expuestas, principalmente la piel de manos y antebrazo y las membranas mucosas del tabique nasal. El cromo (VI) tiene un importante efecto sensibilizante de la piel. Además de los efectos de irritación y ulceración, el cromo puede causar reacciones alérgicas caracterizadas por enrojecimiento severo y edema de la piel. La exposición ocupacional prolongada a cantidades elevadas de cromo (VI) en el aire inspirado (más de 2 mg/m<sup>3</sup>), puede causar irritación de la nariz, sangrado, úlceras y, eventualmente, perforación del tabique nasal. La inhalación por periodos cortos, de pequeñas cantidades de cromo (VI) en el aire, no causa efectos adversos en la mayoría de las personas, sin embargo, en los alérgicos al metal, la exposición a concentraciones elevadas de cromo en el aire de los sitios de trabajo puede desencadenar ataques de asma.

La ingestión de pequeñas cantidades de cromo (VI) no tiene efectos indeseables. Sin embargo, la ingestión accidental o intencional de cantidades elevadas causa un cuadro gastrointestinal agudo con vómitos sanguinolentos, diarrea, sangre en las heces y puede causar colapso cardiovascular y la muerte. Si el intoxicado sobrevive, los efectos posteriores pueden ser necrosis hepática y renal y conducir a la muerte. La exposición a largo plazo a derivados de cromo se ha asociado con cáncer de pulmón, el cual puede aparecer tiempo después de que ha cesado la exposición. Este Cáncer se ha observado en los trabajadores que han estado expuestos a concentraciones de cromo en el aire que son 100 a 1000 veces mayores que las naturales. Aunque no está perfectamente aclarado cuál es la forma de cromo que produce este tipo de cáncer, pues por lo común los trabajadores están expuestos simultáneamente a cromo (III) y cromo (VI), los datos epidemiológicos indican que el agente causal es fundamentalmente el cromo (VI). También se ha demostrado que algunos derivados de cromo (VI) pueden causar cáncer de pulmón en animales. Por su parte, la IARC ha concluido que el cromo (VI) es carcinogénico para los seres humanos y que el cromo (0) y los derivados de cromo (III) aún no pueden clasificarse respecto a su carcinogenicidad para los seres humanos. No existen datos confiables sobre los efectos adversos del cromo en la reproducción, ni hay pruebas de que sea teratogénico para los seres humanos.<sup>(5,6)</sup>

### *2.3 El Cromo y sus aplicaciones*

El cromo se usa ampliamente en la síntesis de compuestos químicos, en el cromado de piezas de muebles, automóviles, equipos eléctricos, herramientas y maquinarias donde el recubrimiento le imparte una resistencia a la corrosión y un brillo decorativo especial; en aleación con hierro y níquel se usa para la fabricación de aceros inoxidables de alta resistencia; en la fabricación de pigmentos inorgánicos (cromatos de plomo, cromato de zinc y el verde de óxido crómico); como anticorrosivo; en la fabricación de vidrio, porcelana y esmaltes de color; en el proceso del curtido del cuero (sulfatos crómicos) y en la industria de tintas, entre otros.<sup>(2)</sup>

La industria textil comprende un conjunto de industrias cuya actividad se centra en la fibra textil. La variedad de fibras textiles existentes y los tratamientos que deben sufrir, hace que estas industrias sean numerosas y variadas. Cada una de las actividades da lugar a la formación de un agua residual según el tratamiento efectuado en una u otra fábrica. En paralelo con el desarrollo progresivo de la industria, en el presente siglo y sobre todo en los últimos decenios la industria textil en el Perú se ha ido perfeccionando cada vez más el mejor uso del material a emplearse en los moldes para la industria de la fundición por una mejor calidad del producto.

Los efluentes textiles contienen compuestos en disolución, en forma coloidal o en suspensión, de naturaleza química muy diversa que los contaminan variando la composición y el caudal considerablemente con el tiempo. Sin embargo se aprecia una concentración creciente de productos tóxicos como metales pesados, compuestos organoclorados o sustancias sintetizadas recientemente de efectos desconocidos en el interior de los organismos en el transcurso de las redes tróficas.

Los vertidos de sustancias en principio no consideradas como tóxicas, biodegradables y fertilizantes producen un desequilibrio de las condiciones de vida, de tal manera, que no puede afirmarse que los danos causados sean menos graves que los ocasionados por los productos considerados realmente como tóxicos.

En cuando a los tóxicos pertenecientes a la categoría de los metales pesados, es sin duda el Cromo el más importante de los presentes en los efluentes textiles y casi en su totalidad proviene de los procesos de pintura con colorantes cromatables.<sup>(7)</sup>

## 2.4 Legislación y límites permisibles

El estado peruano establece mediante el decreto supremo No 010-2010-MINAM los límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos una concentración de 0.1 mg/L de Cromo VI en aguas provenientes de industrias. Mientras que la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) ha establecido como límite máximo permisible la concentración de 0.050 mg/L de Cromo total en agua potable. En los Estados Unidos se ha establecido que la concentración de cromo total en agua de bebida no puede exceder los 100 µg/L; este valor es inferior a la concentración de cromo que se ha comprobado que no tienen efectos adversos <sup>(6)</sup>. Las concentraciones de cromo permitidas y su tiempo de exposición se detallan a continuación en la Tabla N°5.

**Tabla N°5**  
Concentraciones y tiempo de exposición seguros para el Cromo<sup>1</sup>

Concentración	Máximo tiempo de exposición
1400 µg/L	durante 10 días, para niños
240 µg/L	por tiempo prolongado, para niños
840 µg/L	para exposición crónica en adultos
120 µg/L	para la exposición de adultos durante toda la vida

1. Sociedad Mexicana de Toxicología

En los Estados Unidos, LA OSHA ha establecido que la concentración máxima de cromo en aire por día de 8 horas y semana de 40 horas es de 500 µg de cromo soluble -sales crómicas, cromo III, o cromos de cromo III- por metro cúbico de aire y de 1000 µg/m<sup>3</sup> para cromo metálico y sales insolubles.

Por su parte, el NIOSH considera que todos los derivados de cromo VI -incluyendo el ácido crómico- son carcinógenos potenciales para los trabajadores y recomienda un límite de exposición de 1 µg/m<sup>3</sup> para un día de trabajo de 10 horas y una semana de 40 horas. <sup>(6,18)</sup>

## 2.5 Métodos convencionales de remoción de Cromo

El Cromo, en especial el de valencia (VI) se encuentra generalmente bajo la forma de aniones cromatos o dicromatos solubles los cuales son muy tóxicos debido a su alto poder oxidante; por otra parte el Cr(III) forma complejos altamente estables con gran cantidad de sustancias y puede ser encontrado tanto bajo la forma catiónica ( $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})^{+2}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$ ) como aniónica ( $\text{CrCl}_6^{-3}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$ ). A diferencia del Cr (VI), el Cr (III) no es oxidante y por ello presenta menor toxicidad<sup>(37)</sup>. Debido a esto, es que la reducción de Cr (VI) a Cr (III) representa esencialmente la manera de descontaminar ambientes, ya sean aguas o suelos, contaminados con cromo en su forma hexavalente. Las metodologías convencionales para el tratamiento de residuos que contengan Cr (VI) incluyen su reducción química a Cr (III) y posterior precipitación como  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  en condiciones alcalinas, o su remoción por intercambio iónico y adsorción<sup>(36)</sup>. Todos estos métodos presentan algunas desventajas ya que la precipitación alcalina produce una gran cantidad de barros químicos y el intercambio iónico y la adsorción pueden ser costosos y muchas veces poco específicos para remover Cr (VI) en presencia de otros iones.

- **Métodos por precipitación**

Existen varias opciones para recuperar y reutilizar el cromo, el método más utilizado es el de precipitación de cromo con un álcali y su posterior redisolución después de un correspondiente acondicionamiento. La eficacia de estos procedimientos depende en gran medida del agua residual, que podría ser únicamente el baño residual de curtición o la mezcla de baños con otro tipo de aguas.

Para la precipitación se requiere recipiente colectores, tamiz de malla gruesa, material de precipitación, filtrado y control analítico tanto en el baño a tratar como en los producidos por este proceso. La recuperación de Cromo de los baño agotados de curtido está basado en su reacción de precipitación del Cr (III) como  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  y su posterior redisolución con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

La precipitación de cromo es posible con cualquier álcali o agente basificante que eleve el pH del medio hasta valor de 9. La solubilidad del  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  en agua es de  $1.24 \times 10^{-8}$  M. se puede utilizar diferentes agentes precipitantes como el hidróxido de sodio, hidróxido de calcio (cal apagada) y

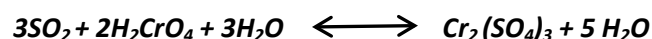
urea de grado comercial. La precipitación con hidróxido de sodio se realizó por adición de una solución acuosa del 25% (p/v) sobre el baño agotado con agitación mecánica hasta alcanzar un pH =9 y posterior calentamiento entre 70 - 80 C. Posteriormente esta solución se calienta para promover la hidrólisis de la urea y alcanzar la precipitación total del cromo, también se utiliza MgO pero este reactivo suele ser tener un costo más alto para su ejecución.

Se observa que el cromo hexavalente (VI) no forma hidróxido insoluble pero el trivalente (III) si lo forma. Así, para remover el cromo hexavalente se debe recurrir a una primer etapa de reducción, seguida de una segunda etapa de formación del hidróxido de Cr (III) y, finalmente, una sedimentación o filtración (o ambas, según sea el objetivo de concentración final).

#### *Primer Reactor (Reducción de Cromo VI a Cromo III)*

La primera etapa de reacción, según se declaró más arriba, se realiza en un primer reactor, cuya entrada tendrá un caudal (que determina el tamaño del equipo) determinado por los procesos aguas arriba, y una concentración variable de Cr (III) y Cr (VI). La primera etapa tiene como objetivo de diseño producir el mismo caudal pero garantizando que todo el cromo esté en el estado (III). Esta reacción es rápida si se garantiza un ambiente ácido (pH 2 a 3). Para asegurar la reacción se deberá agregar un agente reductor. Los agentes reductores son más bien clásicos en la industria química y se suele recurrir a anhídrido sulfuroso, SO<sub>2</sub>, si bien el uso de gases podría ser incómodo así que se recurre a ácido sulfuroso (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), bisulfito de sodio (NaHSO<sub>3</sub>) o metabisulfito de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), y se espera que de estos tres reactivos se genere SO<sub>2</sub> en solución acuosa.

La estequiometría, para el caso del anhídrido sulfuroso es:

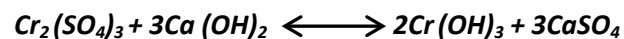


Se observa que el primer reactor debe asegurar un pH ácido (para exacerbar la solubilidad del cromo, formando el ácido crómico), entre pH 2 y 3. Como es habitual, los potenciales de óxido reducción cambian bruscamente al agotarse la especie oxidante o la especie reductora. En consecuencia, la dosificación del agente reductor se podrá realizar manteniendo el potencial de

óxido reducción que refleje una casi total conversión de Cr (VI) a Cr (III).

### *Segundo Reactor (Producción del Hidróxido de Cromo III)*

Luego de la primera reacción, se obtiene una línea de proceso con pH entre 2 y 3 y todo el cromo en su estado más reducido, Cr (III). La formación del hidróxido se realiza en un segundo sistema que puede ser muy variado. En este caso, se adoptará la reacción de la línea de proceso con cal (apagada), en la forma  $\text{Ca(OH)}_2$ . La estequiometría será:



Las aguas resultantes pueden ser dispuestas o recicladas a proceso, la segunda alternativa es la preferida para minimizar la contaminación. Por otra parte, el hidróxido de cromo III es considerado inocuo por las reglas ambientales del hemisferio norte. <sup>(39)</sup>

- ***Métodos por intercambio iónico utilizando resinas***

Ciertos materiales pueden intercambiar sus iones por otros iones de una solución de contacto con ellos. Existen materiales naturales, artificiales y sintéticos que tienen esta capacidad. Los materiales sintéticos reciben el nombre de resinas de intercambio iónico y están constituidos por una matriz de polímero orgánico a la se le han introducido grupos ionizables específicos. Por ejemplo, el polímero a basa de poliesterireno y divinilbenceno posee entrecruzamiento entre las unidades de polímero que pueden variarse, así como la naturaleza de los grupos ionizables insertados, que pueden modificarse las propiedades de la resina con respecto a su capacidad de intercambio. Las resinas de intercambio iónico se utilizan frecuentemente en la purificación de aguas de alta pureza a partir de agua potable. También es aplicable a la depuración de aguas residuales, en ciertos casos parece el tratamiento ideal en la eliminación de iones metálicos de efluentes. Para el caso específico del Cromo en aguas residuales primero se debe realizar la oxidación de Cromo III a Cromo VI para su posterior fijación en una columna de intercambio aniónico conteniente una resina fuertemente básica, seguida de la recuperación por reducción de Cromo VI a Cromo III en el seno mismo de la columna de intercambio.

- ***Métodos de remoción de cromo con zeolitas***

Las zeolitas, al igual que el resto de los filosilicatos, presentan una estructura basada en el apilamiento de planos de iones oxígeno y oxidrilos. Las importantes aplicaciones industriales de este grupo de minerales radican en sus propiedades fisicoquímicas. Dichas propiedades derivan, principalmente, de su extremadamente pequeño tamaño (inferior a  $2\ \mu\text{m}$ ) y su morfología laminar (filosilicatos)

Las arcillas poseen una elevada superficie específica, muy importante para ciertos usos industriales en los que la interacción sólido-fluido depende directamente de esta propiedad. La naturaleza microporosa de las zeolitas les permite adsorber moléculas o iones igual en tamaño o más pequeños que el poro abierto. Por esta razón las zeolitas se han ganado el nombre de tamiz molecular. Entre las zeolitas más utilizadas están la montmorillonita, cinerita y otras.

Este tratamiento presenta limitaciones debido a la alta cantidad de zeolita que se necesita para purificar las aguas contaminadas.

- ***Métodos de recuperación por adsorción en carbón activado***

Se sabe que los carbones activados son materiales utilizados en variadas aplicaciones, entre las que se destacan los procesos de purificación y tratamiento de aguas residuales para retener en su superficie tanto compuestos orgánicos como inorgánicos. La gran superficie tanto compuestos orgánicos como inorgánicos. La gran superficie específica de estos materiales puede fluctuar normalmente 700 a 1200  $\text{m}^2/\text{g}$  en los carbones activados granulares y la existencia de una importante red de poros de transporte, sumado a su gran estabilidad química, hacen que los procesos de tratamiento de aguas residuales con este tipo de sólidos sean por lo general muy eficientes.

Los estudios efectuados referente a la retención de sales de cromo en solución acuosa por carbones activados muestran que el Cr (VI) se retiene en mayor grado que el Cr (III), y que la retención depende del pH del medio, temperatura, concentración de la especie, presencia de iones expectantes, etc, además de la textura y características químicas del carbón activado. <sup>(71)</sup>

## 2.6 Métodos biotecnológicos de remoción de Cromo

En general, los tratamientos tecnológicos utilizados en la remoción de cromo (Cr) pueden ser bastante costosos, requieren de mucha energía o altas cantidades de reactivos y pueden crear otras formas de desechos, además, en concentraciones muy bajas, estos métodos son ineficientes <sup>(9)</sup>.

Los microorganismos son una alternativa potencial sobre los procesos convencionales para la recuperación de metales de soluciones industriales, este fenómeno es conocido como biosorción y se refiere a las interacciones físico-químicas entre la biomasa microbiana y el metal pesado <sup>(10)</sup>.

El principal problema de los metales pesados es que no pueden ser biodegradados. Sin embargo, los microorganismos pueden interactuar con ellos transformándolos; las principales transformaciones se dan en el estado de oxidación <sup>(11)</sup>. Es muy común que los microorganismos nativos de sitios contaminados con cromo muestren resistencia al ión, debido a que poseen mecanismos activos o pasivos que les permiten removerlo o detoxificarlo entre las bacterias descritas se incluyen las cianobacterias *Nostoc calcicola* HH-12 y *Chroococcus sp.* HH-11, *Acinetobacter sp.*, *Streptococcus equisimilis* (CECT 926), *Bacillus coagulans* (CECT 12) y *E. coli* <sup>(12)</sup>. La remoción de Cr VI por levaduras también está ganando mucha atención desde que estos microorganismos eucarióticos se han experimentado para ser útiles en procesos biotecnológicos <sup>(13)</sup>. Consorcios microbianos han sido reportados, utilizando una bacteria (*Bacillus thuringiensis*), una levadura (*Candida etchellsii*) y un protozoo (*Stilonychia mytilus*) <sup>(14)</sup>. Sin embargo se tiene reportes en los que también se utiliza consorcio de seis bacterias Gram negativas y tres Gram positivas para la biosorción de Cr VI <sup>(15)</sup>. Y otros en los cuales la remoción de Cr VI se da de manera anaeróbica conjuntamente con la degradación de fenol realizado por un consorcio de bacterias y por el consorcio establecido entre *Bacillus sp.* y *Pseudomonas putida* Migula <sup>(16)</sup>. En la actualidad la utilización de métodos biológicos o biorremediación para la descontaminación de aguas residuales conteniendo Cr (VI) y Cr (III) es un campo emergente. Se han descrito un gran número de géneros bacterianos con la capacidad de reducir el Cr (VI) a Cr (III). Si bien los cultivos puros son de gran utilidad a la hora de estudiar los mecanismos involucrados en el proceso de reducción de Cromo, los mismos presentan desventajas relacionadas con la necesidad de trabajar en condiciones de esterilidad. <sup>(38)</sup>

- ***Microorganismos degradadores de Cromo:***

Existe una serie de microorganismos descritos como degradadores de Cromo descritos en la literatura como el *Bacillus thuringiensis* <sup>(13)</sup>, este microorganismos es una bacteria Gram positiva que habita en el suelo, y que se utiliza comúnmente como una alternativa biológica al pesticida. También se le puede extraer la toxina Cry y utilizarla como plaguicida. El *Bacillus thuringiensis* también aparece de manera natural en el intestino de las orugas de diferentes tipos de polillas y de mariposas, así como en las superficies poco iluminadas de las plantas. <sup>(41)</sup> Durante la esporulación, muchas cepas de *Bacillus thuringiensis* producen cristales proteínicos, conocidos como  $\delta$ -endotoxinas, que poseen propiedades insecticidas. Por esta razón se ha empleado la Bt como insecticida y, más recientemente, para producir organismos genéticamente modificados. Sin embargo, existen cepas de Bt que producen cristal que no tiene acción insecticida. <sup>(42)</sup>

Otro microorganismo que se ha venido estudiando en los últimos años en la biorremediación de Cromo es la *Pseudomonas putida* <sup>(47, 48)</sup>. Este microorganismo presenta un metabolismo diverso y puede ser explotada para a biorremediación de distintos compuestos, por ejemplo, se utiliza como un inoculante de suelo para remediar naftaleno suelos contaminados. <sup>(43)</sup> La P. putida es capaz de convertir estireno aceite en el plástico biodegradable PHA . <sup>(44,45)</sup> Esto puede ser de utilidad en el eficaz reciclaje de poliestireno de espuma, de lo contrario cree que no biodegradable.

Por otro lado, es ampliamente descrito que el *Streptococcus faecalis* posee secuencias genéticas capaces de realizar biorremediación de metales <sup>(46)</sup>. El *Streptococcus faecalis* es una bacteria Gram-positiva comensal, que habita el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. Como otras spp. del género *Enterococcus*, *E. faecalis* puede causar infecciones comprometidas en humanos, especialmente en ambiente de hospital. La existencia de enterococos se potencia porque ha tenido la habilidad de adquirir resistencia a virtualmente todos los antibióticos en uso. El hábitat normal de estos es el tubo digestivo de animales de sangre caliente. Son indicadores de contaminación fecal, por lo que su presencia en los alimentos indica falta de higiene o defectuosas condiciones de conservación, excepto en alimentos en los que interviene como flora bacteriana natural de procesos fermentativos, como es el caso de quesos, embutidos crudos e incluso productos cárnicos y son muy resistentes a condiciones adversas (congelación, desecación, tratamiento térmico, etc.) por lo que son buenos indicadores para valorar las condiciones higiénicas y de conservación de los alimentos congelados y desecados. *E.*

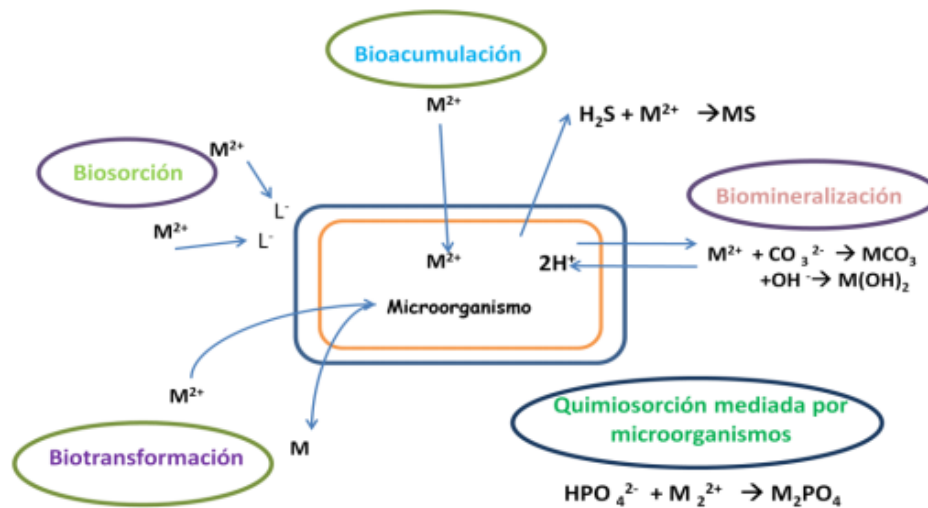
*faecalis* puede vivir en ambientes extremos que incluyen pH altamente alcalino de 9,6 y elevadas concentraciones de sal. <sup>(56)</sup>

Por último, el *Corynebacterium spp* también ha sido estudiado por su capacidad de biorremediación con Cromo en aguas residuales<sup>(47)</sup>. *Corynebacterium* es un género de bacterias, bacilos y gram positivos, inmóviles, anaerobio facultativos, pertenecientes al filo actinobacteria. Es uno de los géneros más numerosos de actinobacterias con más de 50 especies, la mayoría no causa enfermedades, sino que son parte de la flora saprófita de la piel humana. <sup>(49)</sup>. Las características más relevantes del género *Corynebacterium* fueron descritas por Collins y Cummins (1986).<sup>(50)</sup> Se trata de bacterias Gram-positivas, catalasa positivas, no esporuladas, que carecen de motilidad, bacilos rectos o ligeramente curvados cuyo tamaño oscila entre 2-6 micrómetros de longitud y 0,5 micrometros de diámetro, a menudo con la típica forma de V (lo que también se denomina “forma de letras chinas”), aunque también aparecen formas elipsoidales, son aerobias o anaerobias facultativas, quimioorganotrofos, con un contenido en G:C genómico entre 51–65%. El pleomorfismo en su ciclo de vida se observa en formas bacilares de longitud diversa y frecuentes engrosamientos en los extremos, estando marcadamente influido por las condiciones del cultivo <sup>(51)</sup>. Con respecto a los requerimientos nutricionales, todos ellos necesitan biotina para su crecimiento y algunas cepas requieren además tiamina y ácido p-aminobenzoico (PABA). Algunas especies de *Corynebacterium* tienen genomas secuenciados que varían de 2.5 - 3 Mbp. La bacteria crece en caldo simple, medio de Loeffler, agar sangre y telurito potásico (AST), formando colonias pequeñas grisáceas de aspecto granuloso, translúcidas con centros opacos, convexas con bordes continuos. El color tiende a ser blanco amarillento en los medios de cultivo de Loeffler. En AST, el organismo puede formar colonias grises con centros negros y bordes dentados dando la apariencia de flores (*C. gravis*), otras tienen bordes contínuos (*C. mitis*), mientras que otras tienen bordes intermedios entre continuas y dentadas (*C. intermedium*). <sup>(52)</sup>

- ***Mecanismos utilizados por los microorganismos***

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de

detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal <sup>(19)</sup>. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos <sup>(20)</sup>. Estos fenómenos son: biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción mediada por microorganismos y se ilustran en la Figura N°1.



**FIGURA N° 1** Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos (Vullo,2003)

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, zinc y cobre <sup>(21, 22, 23, 24)</sup>. Los microorganismos utilizados como biosorbentes, aislados a partir de ecosistemas contaminados, retienen los metales pesados a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con soluciones de dichos metales. Esto minimiza los costos en un proceso de remediación, ya que no requiere el agregado de nutrientes al sistema, al no requerir un metabolismo microbiano activo. La biomasa capaz de participar en estos procesos es fácilmente extraíble de sistemas acuosos como cursos de aguas o efluentes de diversos orígenes, por lo que el proceso global de biorremediación sería rentable. Es por ello que la búsqueda de este tipo de microorganismos se encuentra en crecimiento constante, junto con el estudio de sistemas biosorbentes como por ejemplo la

utilización de consorcios microbianos, o sistemas mixtos formados por microorganismos y macromoléculas (polímeros) sorbentes, que incrementarían los rendimientos en la captación de mezclas de metales pesados (25, 26, 27, 28, 29)

Los fenómenos de biosorción se caracterizan por la retención del metal mediante una interacción físicoquímica del metal con ligandos pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares, como por ejemplo carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo. Es un mecanismo de cinética rápida que no presenta una alta dependencia con la temperatura y en muchos casos puede estudiarse en detalle mediante la construcción de los modelos de isothermas de Langmuir y Freundlich. El pH de la solución es un factor crucial en la biosorción de metales pesados. El valor del pH influencia significativamente los sitios de disociación sobre la superficie de la biomasa y el comportamiento químico del metal pesado, por ejemplo hidrólisis, formación de complejos por ligandos orgánicos y/o inorgánicos, reacciones redox, y precipitación, como también la especie del metal y la disponibilidad. La biosorción de cromo total varía como función del pH, con iones presentes como ácido crómico ( $\text{H}_2\text{CrO}_4$ ), ión hidrógeno cromato ( $\text{HCrO}_4^-$ ), ión dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ), ión cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) y Cr (III) que son las especies dominantes. A pH 1-2, el ión hidrógeno cromato ( $\text{HCrO}_4^-$ ) es la especie dominante<sup>(30)</sup>. La biosorción del cromo a bajo pH sugiere que la carga negativa de las especies de cromo (cromato/dicromato) se unen por una atracción electrostática a grupos funcionales con carga positiva sobre la superficie de los biosorbentes. Cuando el pH incrementa las cargas de la superficie pasan a ser negativas y la biosorción disminuye. En condiciones alcalinas, los grupos carboxilos se encuentran desprotonados y tienen una carga negativa. En bajas concentraciones de cromo, la principal especie es  $\text{HCrO}_4^-$  con pH debajo de 5, mientras que la especie  $\text{CrO}_4^{2-}$  incrementa con el aumento del valor de pH y se convierte en la principal especie a pH por encima de 7<sup>(31)</sup>. La biosorción del metal depende de la protonación o desprotonación de los grupos funcionales sobre la pared celular<sup>(32)</sup>

La bioacumulación celular involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema  $\text{H}^+$ -ATPasa. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas

o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos. Algunos ejemplos de este proceso son muy interesantes, como el caso de acumulación de uranio por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue detectado íntegramente en el citoplasma, al igual que en la levadura *Saccaromyces cerevisiae* <sup>(20)</sup>.

La biomineralización es un mecanismo por el cual los microorganismos son capaces de precipitar metales y radionuclidos como carbonatos e hidróxidos, mediante un mecanismo de resistencia codificado en plásmidos. Este mecanismo aparece por el funcionamiento de una bomba que expulsa el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de H<sup>+</sup> hacia el interior celular. Esto produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal pesado. Otra forma de precipitar los metales es a través de la formación de sulfuros o fosfatos, como resultado de alguna actividad enzimática celular. Un ejemplo de ello es la precipitación de sulfuros metálicos en reactores con cultivos mixtos de bacterias reductoras de sulfato <sup>(33, 20)</sup> o la acumulación de CdS en la pared celular de las bacterias *Klebsiella planticola* y *Pseudomonas aeruginosa* <sup>(34)</sup>.

La biotransformación es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal pesado, como por ejemplo en el estado de oxidación o metilación. Esta transformación biológica de los metales pesados que resultan tóxicos mediada por enzimas microbianas puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles. El ejemplo más claro es el ciclo del Hg en la naturaleza, donde la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede reducir el catión Hg<sup>2+</sup> a Hg<sup>0</sup>, y otros organismos pueden luego metilarlo dando como producto el CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> y (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg, que son volátiles y aún más tóxicos que el propio Hg.

Las reducciones de V(V) a V(III), Au(III) a Au(0) y Cr(VI) a Cr(III), conducen a la precipitación del metal bajo condiciones fisiológicas. Entre estos últimos el Cr es el metal más ampliamente utilizado en la industria de aceros, automóviles, equipamiento de hospitales y curtiembres, entre

otras. El Cr (VI) es un contaminante de prioridad 1 catalogado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), ya que es estable en solución acuosa y por lo tanto de alta movilidad en diferentes ambientes, con un alto potencial mutagénico y carcinogénico. El pasaje a Cr(III) produce la inmovilización por precipitación de hidróxidos y la disminución en la mutagenicidad. La utilización de microorganismos resistentes a Cr con capacidad de bioconversión Cr(VI) en Cr(III) es de fundamental importancia en el tratamiento biológico de efluentes industriales <sup>(20, 23)</sup>.

En la quimiosorción mediada por microorganismos se pueden describir aquella clase de reacciones en donde los microorganismos biomineralizan un metal, formando un depósito primario. Este depósito primario funciona como núcleo de cristalización, con la subsecuente deposición del metal de interés, promoviendo y acelerando así el mecanismo de mineralización. Un ejemplo de este proceso es el agregado de Fe en un efluente a tratar, en presencia de bacterias reductoras del sulfato. Estos microorganismos producen sulfuros que precipitan en forma de FeS, sobre la superficie celular. Los otros metales contaminantes utilizan el FeS formado como soporte y cristalizan sobre sus cristales. Luego, aprovechando las propiedades magnéticas del Fe, pueden separarse fácilmente de la fase soluble, decontaminando así el material <sup>(20)</sup>.

- ***Biosorción de microorganismos como mecanismos de remoción***

La biosorción de metales pesados es un proceso pasivo no metabólico, de la unión del metal con el biosorbente. Algunos desechos industriales son utilizados para este propósito como lo son bacterias, levaduras, hongos y algas; los cuales pueden funcionar como biosorbentes de metales pesados. La biosorción es considerada un proceso físico-químico rápido <sup>(72)</sup>. En 1995 se hizo un esfuerzo para resumir el tipo y eficacia de los biosorbentes, así como los procesos de tratamiento por biosorción desde entonces los estudios han continuado de manera intensiva, considerándose el empleo de biomasa bacteriana o fúngica, cultivadas en lote, en biorreactores o inmovilizadas en diferentes matrices, para remover por biosorción el cromo presente en medio de cultivo o en efluentes industriales. El uso de biosorbentes para la remoción de contaminantes tóxicos o para la recuperación de valiosos recursos de aguas residuales, es uno de los más recientes

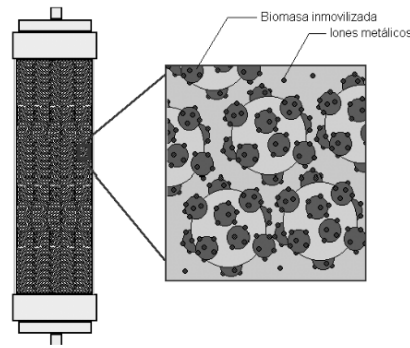
descubrimientos en el medio ambiente o recursos biológicos de tecnología. Las mayores ventajas de esta tecnología sobre la convencional incluye no solamente su bajo costo sino también su alta eficiencia, la disminución de químicos o lodos biológicos, la habilidad de regenerar los biosorbentes y la posibilidad de recuperar el metal luego de la adsorción.

La compleja estructura de la biomasa implica que existe muchas vías por las que los biosorbentes remueven los contaminantes; por ejemplo, la estructura y aspectos funcionales de polímeros extracelulares de microorganismos como grupos aminas, amidas, carbonilos, carboxilos, hidroxilos, imidazoles, sulfonatos, sulfhidrilos, fenólicos, fosfatos y fosfodiéster. Sin embargo, la presencia de algunos grupos funcionales no garantiza una satisfactoria biosorción de contaminantes, pues existen barreras conformacionales o estéricas, entre otras, que pueden estar presentes. Para que se pueda obtener una eficiente biosorción de la biomasa depende de varios factores, incluyendo el número de sitios reactivos en el biosorbente, accesibilidad a los sitios, estado químico de los sitios y afinidad entre los sitios y el contaminante particular de interés. La biosorción de colorantes y metales ocurre principalmente a través de interacciones como: intercambio iónico, formación de complejos, adsorción por fuerzas físicas, precipitación y atrapamiento en espacios interiores. <sup>(73)</sup>

## ***2.7. Diseño de sistemas para la remediación de aguas residuales contaminadas con Cromo***

### *Por Inmovilización de la biomasa en polímeros de silicio*

Para determinar la capacidad de remover cromo (III) en sistemas continuos. la biomasa se puede inmovilizar en matrices de polisilicato utilizando ácido sulfúrico al 5% con  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  al 6% hasta alcanzar un pH de 2. Normalmente a esas soluciones se les agrega la biomasa en cuestión. Posteriormente se suspende en agitación para que se forme el polímero, es así como se consigue al polímero con la biomasa inmovilizada luego esta tendrá que ser secada y posteriormente instalada en una columna de inmovilización. <sup>(40)</sup> El diseño de inmovilización de biomasa se presenta en la Figura N°2.



**FIGURA N°2.** Esquema de inmovilización de biomasa y unión a iones metálicos.<sup>1</sup> 1. Revista mexicana de Ingeniería Química Vol 1 (2002)

### *2.8 Perspectivas futuras:*

La producción de cueros en Arequipa va en crecimiento y cerca de 150 curtiembres se encuentran operando actualmente en la ciudad. El Parque Industrial Río Seco – (PIRS) es la sede principal de estas industrias y ha venido creciendo de manera desordenada y se proyecta a un mayor crecimiento en el futuro, actualmente este Parque Industrial no cuenta con un sistema de tratamiento de aguas residuales. Con esta investigación se pretende presentar una propuesta de solución en el tratamiento de aguas residuales de curtiembres y constaría en emplear microorganismos capaces de reducir las cantidades tanto de Cromo III y Cromo VI en estas aguas y así reducir el impacto ambiental que tienen estos tipos de desechos industriales en la ciudad de Arequipa.

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS:

#### **3.1 CAMPO DE INVESTIGACIÓN:**

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio H-302 del Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa-Perú. Las unidades de estudio fueron las aguas contaminadas con la microflora nativa del Parque Industrial Rio Seco. Las muestras se tomaron de la laguna de aguas de oxidación del Parque Industrial de Rio Seco de la ciudad de Arequipa-Perú, coordenadas 16° 21'49.21'' S , 71°36' 25.47''O.

#### **3.2 MATERIALES:**

Material Biológico:

- Muestras de aguas residuales superficiales (S) y Profundas (P) del PIRS

Reactivos:

- Peptona
- Extracto levadura
- Agar Plate Count
- Agar Sabouraud
- Sulfato básico de cromo (III) de uso industrial
- Glucosa
- Agar-agar
- Medio TSI
- Urea Christensen
- Caldo MRVP
- Rojo de metilo
- Reactivo de Kovacs
- Anfotericina B
- KOH 40%
- Safranina

- Cristal violeta
- Alcohol acetona
- Medio para algas Nutrafin™
- Agar Sangre
- Tween 80 al 1%
- Peróxido de hidrogeno
- Fucsina básica
- Azul de metileno
- Alcohol- Acido
- Aceite de inmersión
- Dicromato de Potasio
- 1,5 Difenilcarbazida, (C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O) q.p Merck
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido Clorhídrico 0.5N
- Nitrato de Sodio 0.1M
- Permanganato de Potasio
- Azida de Sodio
- Naranja de Metilo al 1%
- Hidróxido de Amonio concentrado
- Acetona

Material de vidrio:

- Placas Petri descartables de 10cm y 5 cm
- Probeta
- Frascos de vidrio de 1litro de capacidad
- Laminas portaobjetos
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Pipetas estériles
- Fiolas

- Pipetas Pasteur
- Fiolas
- Beakers
- Bagueta
- Pipetas graduadas
- Frascos de vidrio marca BOECO de 250 ml
- Cubetas de vidrio de 5.5 litros de capacidad (10x10x20 cm).

Equipos:

- Microscopio marca Galileo
- Autoclave Fravill
- Estufa de secado y esterilización J-P Selecta
- Incubadora J.P Selecta
- Refrigeradora BOSH
- Multiparámetro HANNA
- Espectrofotometro Spectrum Sp 1105
- Microondas Samsung
- Balanza Analítica Ohaus Adventure
- Balanza Ohaus Scout-pro
- Ph metro Hanna instruments Ph 213

### 3.3 MÉTODOLÓGÍA

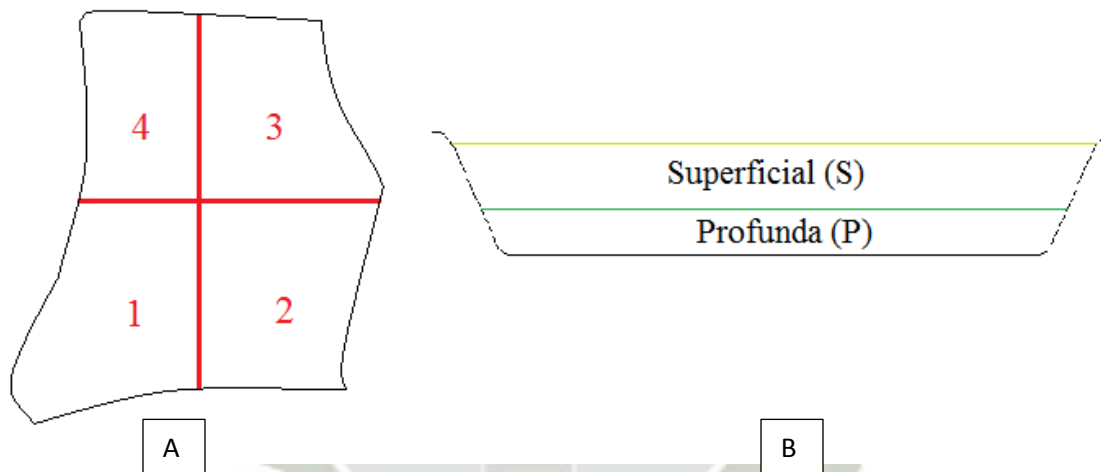
#### RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA:

La ubicación de los puntos de muestreo cumplieron los siguientes criterios de acuerdo al Protocolo de monitoreo de la calidad sanitaria de los recursos hídricos superficiales del Ministerio de Salud- Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA)

- **Identificación:** El punto de muestreo fue identificado y reconocido claramente, de manera que permitió su ubicación exacta en muestreos futuros. Para la determinación de la

ubicación se utilizó el Sistema de Posicionamiento Satelital (GPS), el mismo que registró en coordenadas UTM .

- **Representatividad:** Se evitaron zonas de embalse o turbulencias no característicos del cuerpo de agua. Se eligió un punto en donde la laguna se encontraba en forma regular, accesible y uniforme en profundidad. Fue importante considerar la referencia para la ubicación de un punto de monitoreo como un puente, roca grande, árbol, kilometraje vial y localidad. La toma de muestra se realizó a una profundidad de 1m ; los frascos para las muestras fueron de vidrio y esterilizados. La toma de muestra fue directa dejando un espacio para aireación y mezcla de 1/3 del frasco de muestreo. La representación gráfica de la toma de muestras se presenta en la Figura N°3.



**FIGURA N°3.** Representación Gráfica de la toma de muestras en la laguna del Parque Industrial de Río seco:

**A. Representación gráfica de la laguna del PIRS:** La figura muestra cómo se dividió la laguna y representa los cuatro cuadrantes de donde se tomaron las muestras. **B. Representación gráfica de la profundidad.** La figura representa el rango de profundidad de la laguna de donde se tomaron las muestras tanto superficiales como profundas.

Se tomaron las muestras dividiendo la laguna en cuatro cuadrantes los cuales se codificaron como 1, 2, 3, y 4 respectivamente. Se tomaron muestras de 1 litro de volumen tanto superficiales como profundas correspondiente a cada cuadrante, obteniendo así un total de 8 muestras.

Las muestras obtenidas fueron codificadas de la siguiente manera de acuerdo a la localización y su profundidad. La codificación de las muestras se presenta en la Tabla N°6.

**Tabla N° 6**

Codificación de las muestras recolectadas:

Cuadrante	Superficial <sup>1</sup> (S)	Profunda <sup>2</sup> (P)
1	S1	P1
2	S2	P2
3	S3	P3
4	S4	P4

1. Las muestras superficiales fueron tomadas de la parte más cercana a la superficie, se utilizó en la toma de muestras un recipiente amarrado a una sogá para abarcar el área central del cuadrante. 2. Las muestras profundas se tomaron colocando dentro del recipiente un objeto que le de peso y se sumergió este hasta que tocara fondo.

#### **AISLAMIENTO DE LA MICROFLORA NATIVA:**

##### ***Bacterias:***

El aislamiento se realizó en medio Plate Count (PC) siendo preparadas las placas de la siguiente manera: Se disolvió 0.5 g de Peptona, 0.25 g de extracto de levadura, 0.1 g de glucosa en 100 ml de agua destilada, se ajustó el pH entre 7.2-7.5 y se agregó 1.4 g de Agar-Agar en un matraz de 250 ml. Se llevó el medio al autoclave a 121°C y 1.5 psi de presión por 15 min. Se dejó enfriar hasta una temperatura no menor a los 40°C y se colocó 10µg/ml de Anfotericina B como antimicótico para el control de hongos y levaduras así como también se suplementó con dicromato de potasio y sulfato de cromo a 100 µg /ml y posteriormente se realizó el plaqueo. Se colocó 1ml de agua residual, se esparció en el medio preparado y se dejó incubar a 37°C por 24 horas. Una vez separadas las cepas y duplicadas se utilizó Amoxicilina y Dicloxacilina 5µg/ml para lograr un mejor aislamiento de microorganismos gram positivos como gram negativos.

***Hongos:***

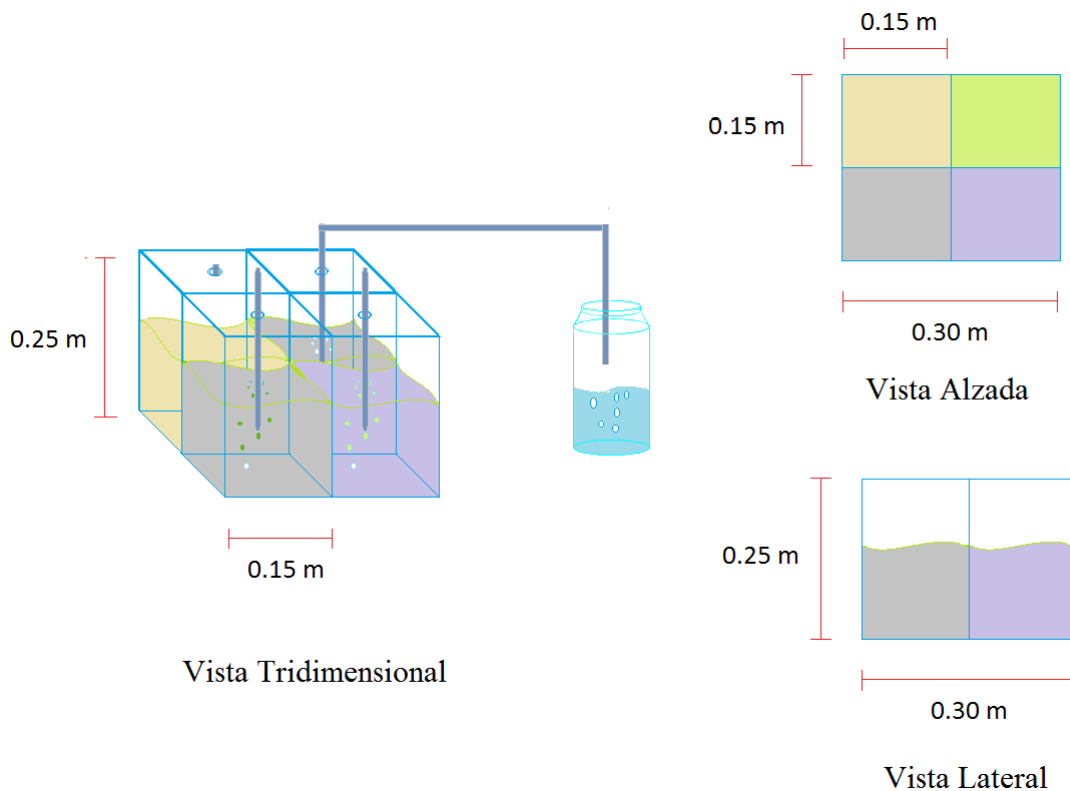
Se preparó medio Sabouraud suspendiendo 6.5 g de medio en 100 ml de agua destilada; se llevó al autoclave por 15 min a 120°C controlando la temperatura para evitar desnaturalización del medio. Se dejó enfriar a una temperatura no menor a los 40°C para así poder colocar los antibióticos Gentamicina (0.04g/l) y Cloranfenicol (0.4g/l) sin producir desnaturalización. Se plaqueo y se colocó 1 ml de muestra de aguas residuales; Se dejó en incubación a 25°C por 5 días; se separaron las cepas que presentaron un desarrollo temprano y se guardaron las placas 14 días, para así analizar las cepas de crecimiento tardío.

***Levaduras:***

Se preparó medio YPD suspendiendo 2.5 g de medio en 100 ml de agua destilada; se llevó al autoclave por 15 min a 121°C. Se dejó enfriar a una temperatura no menor a los 40°C para así poder colocar los antibióticos Gentamicina (0.04g/l) y Cloranfenicol (0.4g/l) sin producir desnaturalización. Se plaqueo y se colocó 1 ml de muestra de aguas residuales; se dejó en incubación a 30C por 5 días y se separaron las cepas para su posterior identificación.

***Algas:***

Se diseñó un sistema de incubación (Figura N°4) el cual consiste en 4 celdas de 20x15x15 cm las cuales contenían 1.5 litros de agua destilada al 10% de solución para algas Nutrafin™; se incluyó en el sistema una fuente de luz T5 por un fotoperiodo de 12 horas además de un sistema de bombeo de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> durante la incubación. El sistema fue inoculado con 5 ml de agua residual por un periodo de 7 días. Posteriormente se procedió a la verificación de presencia de algas y microalgas mediante el microscopio.



**FIGURA N° 4.** Sistema diseñado para el Aislamiento de Algas.

El equipo muestra cuatro cubetas en donde se incubaron las muestras tanto superficiales como profundas, cada cubeta corresponde a cada cuadrante de la laguna. Se suplemento el sistema con CO<sub>2</sub> el cual está instalado en un recipiente externo a la de incubación.

## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MORFOLOGICA DE LAS ESPECIES MICROBIOLÓGICAS AISLADAS

### *Bacterias:*

Las especies aisladas fueron caracterizadas mediante las pruebas bioquímicas siguientes: tinción de gram, catalasa, oxidasa, TSI, H<sub>2</sub>S, Rojo de Metilo, Voges Proskauer, Crecimiento en agar Mc conkey, hemólisis , motilidad, LIA, indol , urea y Tinción Zielh-Neelsen. Así como también fueron caracterizadas morfológicamente mediante tinción gram y observación al microscopio de sus características. Los fundamentos y procedimientos de éstas pruebas se presentan a continuación.

- Tinción de Gram

Las bacterias gram-positivas y gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula gram-positiva es peptidoglicano. La pared de la célula gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano. Debido a su importancia en taxonomía bacteriana y a que indica diferencias fundamentales de la pared celular de las distintas bacterias, describiremos aquí con algún detalle la tinción de Gram y las interpretaciones que actualmente se hacen sobre el porqué de su funcionamiento.

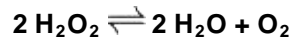
Procedimiento:

- Se realizó un frotis de la muestra y se fijó al calor
- Se agregó el reactivo cristal violeta y se esperó 1 minuto. Todas las células gram positivas y gram negativas se tiñen de color azul-púrpura.
- Se enjuagó con agua.
- Se agregó lugol y se esperó 1 minuto.
- Se enjuagó con agua.
- Se agregó alcohol- acetona y se esperó de 8 a 15 segundos aproximadamente (parte crítica de la coloración).
- Se enjuagó con agua.
- Se agregó el reactivo safranina por 45 segundos. Este tinte dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas.
- Se enjuagó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente
- Se observó al microscopio a 100x con aceite de inmersión. <sup>(61,62)</sup>

- **Prueba de la Catalasa**

El Objetivo es buscar la presencia de la enzima catalasa

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua. Químicamente la catalasa es una hemoproteína de estructura similar a la de la hemoglobina. El peróxido de hidrogeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo de los hidratos de carbono



Procedimiento:

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

- **Prueba de la Coagulasa**

La coagulasa es un enzima capaz de desnaturalizar la fibrina del plasma. El objetivo es buscar en factor de aglutinación de los microorganismos cuando estos se mezclan con el plasma. Esta prueba se utiliza para diferenciar microorganismos del genero *Staphylococcus*. Existe la coagulasa libre y fija

Procedimiento:

Coagulasa fija: Con una asa de siembra, se cogió la colonia a investigar y se colocó en una lámina porta objetos. Se agregó 2 gotas de plasma humano y se suspendió y se inclinó hacia uno y otro lado hasta observar si existe la aparición de grumos. La rápida aparición de precipitado granular después de 30 segundos indica una reacción positiva,

Coagulasa libre: En un tubo de ensayo estéril se colocó 2 gotas de plasma humano, con una asa de siembra se cogió la colonia a investigar y se inculó en el contenido. Se mezcló el contenido evitando agitación. Se colocó el tubo en la incubadora a 37°C por 4 horas hasta observar un coagulo visible. En caso de ser negativo se dejó hasta las 24 horas.

- **Prueba de la Oxidasa**

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

Se trata de un enzima que oxida el citocromo C de la cadena transportadora de e-. Este se detecta utilizando el tetra para fenilendiamina: el reactivo de oxidasa contiene este compuesto que va a ser oxidado por la citocromo C oxidasa. En estado reducido es incolora, pero cuando se oxida vira a púrpura.

Procedimiento:

Se impregnó un pequeño papel de filtro con reactivo de Kovacs; Con una asa de siembra se tomó el microorganismo a investigar y se frotó sobre el papel . Tras unos 30 segundos, observamos si ha ocurrido algún cambio. Las bacterias que dan positivo a esta prueba tienen generalmente un ciclo respiratorio oxidativo. La prueba se considera positiva si se desarrolla un color purpura en el papel.

- **Prueba de la Ureasa**

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

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea dando lugar al carbonato amoniacal, con lo que el medio se alcaliniza.

Procedimiento

Con una asa de siembra se tomó muestra del cultivo a investigar; Se sembró el microorganismo en medio Christensen en tubo inclinado; Se incubó a 37°C hasta detectar cambio de color del indicador La prueba se considera positiva si el color cambia a purpura debido al indicador rojo fenol.

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

El TSI es un medio nutriente y diferencial que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la identificación de la producción de H<sub>2</sub>S .

Procedimiento:

Se inoculó los microorganismos aislados en tubos con medio TSI con inclinado Para eso introducir la punta hasta 3 a 5 mm. del fondo del tubo. Tras retirar el alambre del fondo, estriar el pico con un movimiento hacia uno y otro lado. Incubar a 35° durante 24 horas.

- **Prueba LIA (Lysine Iron Agar ó Agar Lisina Hierro)**

Esta prueba permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de H<sub>2</sub>S ya que es más sensible que el TSI para esta prueba

Procedimiento:

Se inoculó en forma de estría las cepas de los microorganismos aislados en el medio de cultivo LIA inclinado y se dejó incubar por 24 horas a 37° .

- **Prueba MIO (Motility-Indole-Ornitine ó Motilidad-Indol-Ornitina)**

Esta prueba bioquímica permite identificar bacterias de acuerdo a su motilidad a la reacción de Indol a la descarboxilación de la ornitina.

Procedimiento:

Se inoculó los microorganismos aislados en tubos inclinado con medio MIO; se dejó incubar por 24 horas a 37°.

- **Rojo Metilo**

Una de las características taxonómicas que se utilizan para identificar los diferentes géneros de enterobacterias lo constituyen el tipo y la proporción de productos de fermentación que se originan por la fermentación de la glucosa. Se conocen 2 tipos generales: La fermentación ácido-mixta y la fermentación del 2,3 butanodiol. En la fermentación ácido mixta se forman fundamentalmente láctico, acético y succínico, además de etanol, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. En la vía del butanodiol se forman cantidades menores de ácido (acetato y succinato) y los principales productos son el butanodiol, etanol, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo entre 6,0 (amarillo) y 4,4 (rojo),

que se utiliza para visualizar la producción de ácidos por la vía de fermentación ácido mixta.

Procedimiento:

Se inoculó los microorganismos aislados en caldo MRVP y se incubó a 37°C durante 48 horas. Luego de finalizado el tiempo de incubación se agregó unas gotas del reactivo de rojo de metilo. La prueba es positiva si se desarrolla de un color rojo estable. Esto indica que la producción de ácido es suficiente para producir el viraje del indicador y el microorganismo fermentó la glucosa por la vía de ácido mixta. Un color anaranjado, intermedio entre el rojo y el amarillo no es considerado como positivo

- **Voges Proskauer**

En la prueba de Voges-Proskauer se determina la vía de fermentación del butanodiol descrita en la prueba de rojo de metilo. El acetil-metil-carbinol (o acetoína) es un producto intermediario en la producción de butanodiol. En medio alcalino y en presencia de oxígeno la acetoína es oxidada a diacetilo. Este se revela en presencia de alfa-naftol dando un color rojo-fucsia.

Procedimiento:

Se inoculó los microorganismos aislados en caldo RMVP y se incubó a 37°C durante 24 horas. Luego de finalizado el tiempo de incubación se agregó gotas de alfa-naftol al 5% y de KOH al 40%. Se agitó el tubo cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y se dejó reposar durante 10 a 15 minutos. El desarrollo de un color rojo-fucsia luego de 15 minutos indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína y por lo tanto una prueba VP positiva.<sup>(63)</sup>

- **Tinción de Ziehl Neelsen**

Las paredes celulares de ciertos parásitos y bacterias contienen ácidos grasos (ácidos micólicos) de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos. Por esto se denominan ácido-alcohol resistentes. La coloración clásica de Ziehl-Neelsen requiere calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana que contiene

ceras. Al suspender el calentamiento y enfriar con agua, provoca una nueva solidificación de los ácidos grasos de modo que el colorante ya no puede salir de las bacterias. Por otro lado, el calentamiento aumenta la energía cinética de las moléculas del colorante lo cual también facilita su entrada a las bacterias. Las bacterias que resisten la decoloración son de color rojo y las que no, se ven de color azul ya que se utiliza azul de metileno como tinción de contraste

#### Reactivos

- A. Fucsina fenicada de Ziehl- Neelsen
- B. Solución decolorante alcohol- ácido
- C. Solución de azul de metileno

#### Procedimiento:

- Se realizó un frotis de la muestra y se fijó al calor
- Se vertió unas gotas de solución de fucsina fenicada hasta cubrir la preparación
- Se calentó suavemente hasta que se desprenda vapores por tres veces consecutivas, evitando ebullición
- Se eliminó el colorante y lavar con agua corriente
- Se cubrió el portaobjetos con la solución decolorante durante 1 minuto.
- Se lavó con agua
- Se añadió el colorante de contraste azul de metileno y se dejó actuar por un minuto
- Se lavó con agua, evitando el exceso
- Se dejó secar al aire a temperatura ambiente
- Se observó al microscopio a 100 X con aceite de inmersión.

Si los microorganismos se colorean de rojo quieren decir que estos son ácido resistentes, mientras que si se colorean de azul o amarillo no lo son. <sup>(64)</sup>

### ***Hongos y Levaduras:***

La identificación se realizó mediante vista al microscopio con KOH al 10% así como también tinción de gram para determinar la morfología, así como el tiempo de crecimiento y características macroscópicas.

### ***Algas:***

Se identificaron morfológicamente mediante vista al microscopio.

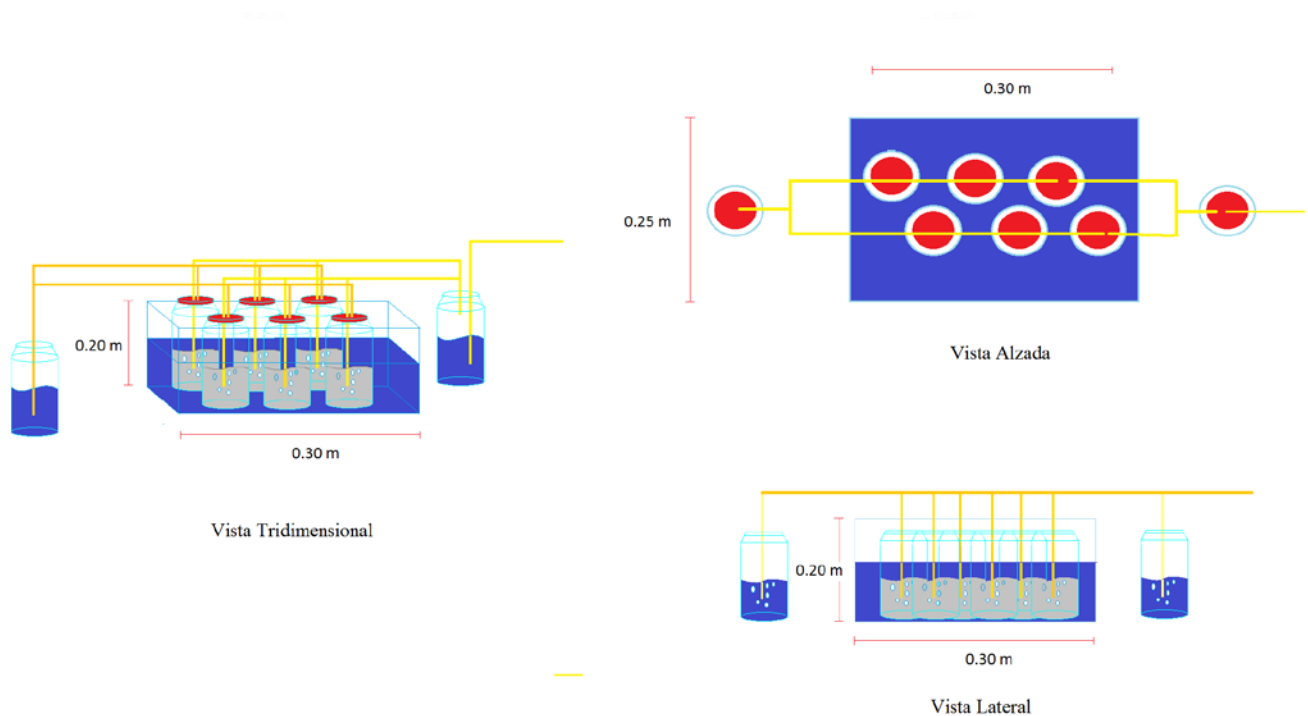
## **EVALUACION DE LA BIOSORCION DE CROMO (III Y VI) EN AGUAS SINTETICAS**

### ***Adaptación:***

El término de adaptación alude a la manera en que ciertos organismos aseguran la supervivencia de su especie en ambientes sometidos a cambios rápidos, produciendo crías adaptadas a distintas condiciones de vida. El mecanismo que utilizan los microorganismos para lograr una adaptación a algún medio específico ha sido ampliamente estudiado. Las bacterias liberan un tipo de molécula al ambiente llamada D-aminoácidos, que son capaces de modular la biosíntesis del peptidoglicano, principal componente de la pared celular bacteriana. La pared bacteriana es la primera barrera que permite a las bacterias protegerse y comunicarse con su entorno por tanto, la regulación de la síntesis de esta envoltura celular es fundamental para la supervivencia de la bacteria. En ciertas ocasiones, cuando las condiciones ambientales se vuelven desfavorables, bien por falta de nutrientes, presencia de antibióticos o cualquier otro tipo de estrés, las bacterias deciden detener su crecimiento por lo tanto, una falta de coordinación entre el ritmo de crecimiento y la síntesis del peptidoglicano supondría un riesgo letal para toda la población. La liberación de los D-aminoácidos permite que toda una comunidad bacteriana sea capaz de sincronizar su síntesis de peptidoglicano con el crecimiento celular en respuesta a los cambios ambientales. Este tipo de sistemas, conocidos como *quórum sensing*, en el que las bacterias liberan metabolitos reguladores al ambiente para generar un tipo de comportamiento social coordinado, suele traducirse en cambios en la expresión de los genes.<sup>(55)</sup>

Se realizó la adaptación de las cepas tanto para Cromo VI utilizando dicromato de potasio a 20 ppm como para Cromo III utilizando Sulfato Básico de Cromo a la misma concentración. Todas las cepas aisladas se inocularon mediante la disolución paulatina del agua residual con agua con

agua con Cr estéril. Se utilizó un sistema consistente en botellas de vidrio estériles colocadas dentro de una chaqueta térmica (Figura N°5). En cada botella se colocó 50 ml de agua residual estéril inoculada con 1 ml de la cepa seleccionada, se dejó incubar a 35°C durante 15 días. Cada día se le agregó 10 ml de solución stock de Dicromato de potasio como de Sulfato de Cromo hasta completar a 500 ml. Se determinó la presencia de microorganismos mediante tinción de gram y siembra en medio de cultivo.



**FIGURA N°5** Sistema diseñado para la adaptación de las especies microbiológicas

(A) Vista tridimensional del sistema, en el cual se observa 6 recipientes de vidrio para cada una de las cepas aisladas, éstos recipientes se encuentran sumergidos en una chaqueta de temperatura (32° C), por el lado derecho vemos se encuentra un recipiente donde se recibe el aire filtrado y se humedece en agua destilada estéril, por el otro extremo se encuentra otro recipiente el cual recibe el CO<sub>2</sub> procedente del crecimiento bacteriano. Así mismo se presentan las vistas frontales (B) y alzada (C) del sistema utilizado.

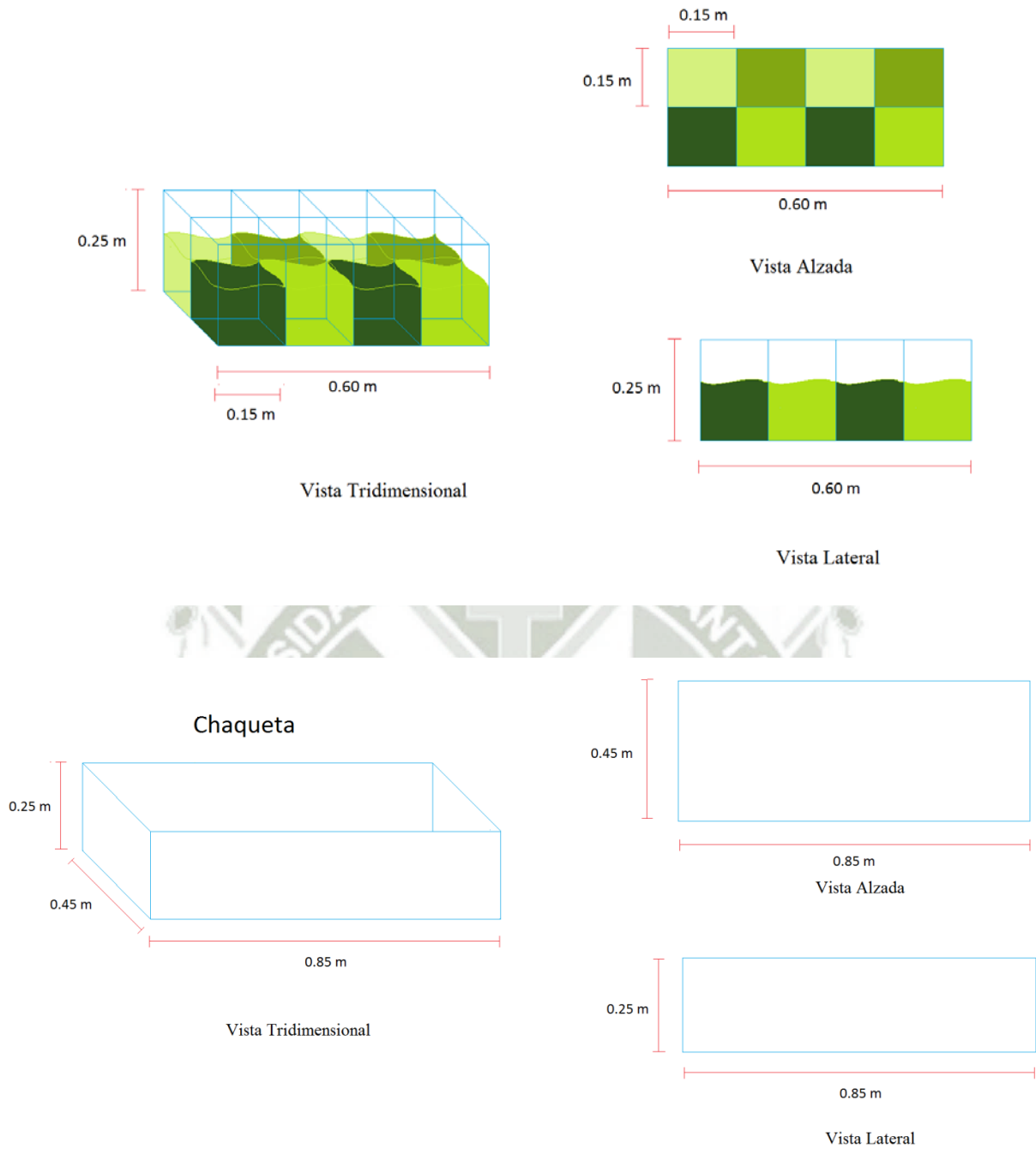
### ***Determinación de la concentración inhibitoria mínima***

La Concentración inhibitoria mínima (CIM), en microbiología, es la concentración más baja de un agente que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación. La concentración mínima inhibitoria es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente inhibitorio

Se determinó la concentración inhibitoria más baja de crecimiento visible en medio sólido tanto para Cromo VI utilizando dicromato de potasio como para Cromo III utilizando Sulfato básico de Cromo , se utilizó las cepas aisladas adaptadas, mencionadas en el punto anterior. Se prepararon concentraciones de 5, 7, 8, 8.5, 12.5, 13, 14, 15, 20 mg/ml en frascos separados estériles, las concentraciones se prepararon en fiola de 25ml y 50 ml. Se colocó en cada placa medio de cultivo Plate Count junto con 1ml de solución preparada, luego de la gelificación se sembró con 1 ml del inóculo y se dejó incubando durante 24 h a 48 h a 35°C y se determinó la inhibición correspondiente.

### ***Biosorción de Cromo (III Y VI) en aguas sintéticas.***

La microflora nativa que se aisló, se pre cultivó en inóculos de 50 ml por 72 horas en caldo Plate Count (PC) a 35°C, luego estas cepas se inocularon en el sistema diseñado (Figura N°6), donde en cada cubeta se colocó un tipo de microorganismo ó consorcios microbianos. El sistema se inoculó en agua preparada con dicromato de potasio a 14ppm y aparte con Sulfato básico de cromo a 9 ppm se utilizó agua con cromo sin microorganismo que fue incluido en el sistema y este nos sirvió como blanco. Todos los cultivos se incubaron por 7 días a 32 °C manteniendo la temperatura isotérmicamente con una chaqueta, teniendo control de temperatura y degradación de Cromo. Se tomaron muestras de 40 ml para cada día, se esterilizaron y procedió a la determinación de concentración de Cr (VI) y Cr (III) mediante la técnica de la difenilcarbazida donde se realizaron lecturas en un espectrofotómetro a 540nm. Las lecturas se realizaron por triplicado.



**FIGURA N°6** Propuesta de sistema de biorremediación de Cromo

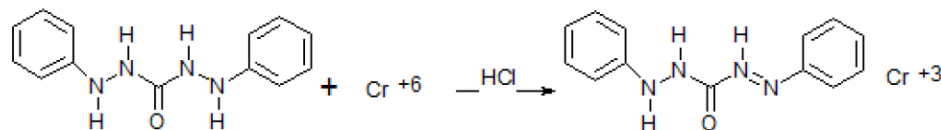
(A) Vista tridimensional donde se observa el sistema conformado por 8 cubetas, las cuales están destinadas para las 6 cepas aisladas más dos consorcios, cada cepa es inoculada con agua sintética con

Cromo VI y III para determinar su depuración. El sistema fue ejecutado a 32°C de temperatura durante 7 días. Así mismo se muestran las vistas laterales (B) y alzada (C).

### a) Determinación de Cromo Hexavalente <sup>(35)</sup>

#### *Fundamento*

De acuerdo con la técnica de la Difenilcarbazida, la cuantificación de Cromo VI en forma independiente durante el proceso de remediación se pudo realizar utilizando la 1,5-difenilcarbazida en medio ácido, para así dar un color violeta, el cual se lee espectrofotométricamente a 540nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de Cromo VI cuya reacción se presenta en la Figura N°7



**FIGURA N°7** .Reacción química del Cromo VI con la 1,5-difenilcarbazida

#### *Preparación de la curva de calibración*

Para la preparación de la curva de calibración se prepararon los siguientes reactivos, que se muestran en la Tabla N°7

**Tabla N°7**

Reactivos utilizados en la curva de calibración<sup>1,2</sup>

Reactivos	Concentración
Difenilcarbazida	5mg/l
Solución Stock de Cromo VI	500mg/l
Solución estándar de Cromo VI	5mg/l
Nitrato de Sodio	0.1 M
Ácido Clorhídrico	0.5 N

1. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2. Benegas, RC (2011)

## a) Solución de difenilcarbazida 5 mg/L

Se pesó 125 mg de 1,5 difenilcarbazida y se disolvió en una fiola de 25 ml con acetona. Se almaceno en un frasco color ámbar con tapa recubierta de teflón; ya que esta solución es transparente, con el tiempo se torna amarillo.

## b) Solución stock de Cromo VI 500 mg/L

En la estufa se secó 2 g de Dicromato de Potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) a una temperatura de  $105^\circ C$  por un periodo de una hora y posteriormente se dejó enfriar en el desecador. Luego se pesó 141.4 mg de dicromato y se disolvió en fiola de 100 ml con agua destilada.

## c) Solución estándar de Cromo VI 5mg/L

Se tomó una alícuota de 1 ml de la solución stock de Cromo VI y se colocó a una fiola de 100 ml que se aforo con agua destilada, 1 ml de esta solución equivale a 5  $\mu g$  de Cromo VI

***Curva de calibración:***

Se prepararon soluciones a partir de la solución estándar de Cromo VI 5mg/L en un rango de 0.08 a 1 mg/L. Se procedió a realizar los cálculos correspondientes para determinar los volúmenes de cada concentración como se presenta en el Anexo N°5. Para la realización del a curva se utilizó 15 ml de Nitrato de Sodio 0.1M, 3 ml de Ácido Clorhídrico 0.5N y 0.5 ml de Difenilcarbazida 5 mg/ L así como también se utilizaron volúmenes de 0.4, 1, 2, 3,4 y 5 ml de stock de Cromo VI y se dejó reposar por 10 minutos hasta desarrollar completamente el color. El blanco se preparó en una fiola de 25 ml con 15ml de Nitrato de Sodio, 1ml de Ácido Clorhídrico y 0.5 ml de 1,5-difenilcarbazida. Las mediciones de las absorbancias de cada solución fueron hechas en una celda de cuarzo de 1 cm a 540 nm. Se construyó una curva de calibración, graficando la absorbancia leída contra los mg/l de Cr (VI).

***Tratamiento de la muestra:***

Se pipeteó 1 ml de cada una de cada una de las muestras y se colocó en una fiola de 25 ml; se añadió 3 ml de Ácido clorhídrico, 0.5 ml de difenilcarbazida y 15 ml de Nitrato de sodio; se dejó en reposo por 10 minutos hasta la formación del color; se enrasó y se midió en el

espectrofotómetro con una celda de cuarzo de 1cm a 540nm junto con el blanco preparado anteriormente.

## b) Determinación de Cromo Trivalente

### *Fundamento*

La determinación de Cromo trivalente se basa en la oxidación de este con un potente agente oxidante como el Permanganato de Potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) el cual convierte el Cromo Trivalente a Hexavalente y posteriormente puede ser detectado por la difenilcarbazida en medio ácido a una longitud de onda de 540nm. La curva de calibración utilizada para este método es la misma que para el cromo hexavalente.

### *Procedimiento*

Para la determinación de Cromo trivalente se utilizaron los reactivos presentados en la Tabla N°8.

**Tabla N°8**

Reactivos utilizados en la determinación de Cromo Trivalente<sup>1</sup>

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración</b>
Difenilcarbazida	5mg/l
Naranja de Metilo	1% ( gotas)
Permanganato de potasio	0.04 g/ml
Azida de Sódica	0.005g/ml
Hidróxido de amonio	Concentrado
Ácido Sulfúrico( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Concentrado

1. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater

Se pipeteó 10 ml de muestra en un matraz de 250 ml, se le añadió 3 gotas de naranja de metilo; se le añadió 3 gotas de hidróxido de amonio concentrado hasta que la solución se tornó amarilla; se añadió 1 + 1 gotas de Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado hasta que la solución cambió de color a rosa y se agregaron 20 gotas en exceso; se ajustó el volumen a unos 40 ml y se llevó al calor hasta que se produzca ebullición. Se añadieron 2 gotas de Permanganato de potasio (

$\text{KMnO}_4$ ) y la solución se tornó violeta, se dejó en ebullición por 1 minuto; se le agregó 1 ml de Azida sódica hasta que la solución empieza a transparentar; se dejó en ebullición por 30 segundos y se dejó enfriar para que la solución se vuelva totalmente transparente; se enrazó en fiola de 100 ml y se mezcló; se añadió 2 ml de solución de difenilcarbazida y se mezcló; se dejó 10 minutos en reposo para que se formase totalmente el color y se midió en una celda de cuarzo de 1 cm a una longitud de onda de 540 nm.

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de la degradación de Cromo (III y VI) se procesaron en el paquete estadístico SPSS vs.19 para así realizar ANOVA y test de Tukey para determinar si los microorganismos tenían una diferencia significativa en su biorremediación.

### **EVALUACION DE LA BIOSORCION DE CROMO (III Y VI) EN AGUAS RESIDUALES CON EL CONSORCIO MICROBIANO DE MEJOR DESEMPEÑO**

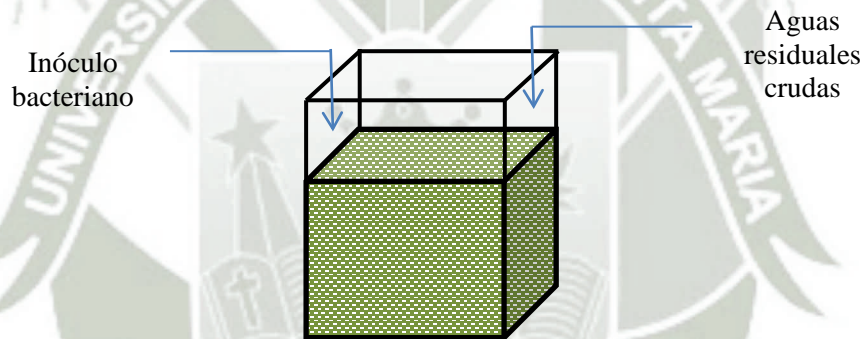
Con el consorcio microbiano de mejor desempeño se escaló a un sistema de bioremediación a nivel piloto de 30 litros en condiciones naturales (estándares) simulando su trabajo en el sistema natural de una laguna de oxidación in-situ. Se inoculó las cepas de mejor desempeño durante 4 días a TPS (temperatura y presión estándares) y se sacaron muestras de 15 ml cada día para el análisis fisicoquímico de las aguas utilizando el multiparámetro HANNA y al finalizar el tiempo de incubación se analizaron los resultados iniciales y finales tanto para Cromo Total, Cromo Hexavalente y de todos los metales presentes en el agua residual.

### **APLICACIÓN A ESCALA DEL CONSORCIO MICROBIANO EN LA BIOREMEDIACIÓN VIRTUAL DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES DEL PARQUE INDUSTRIAL DE RIO SECO - PIRS**

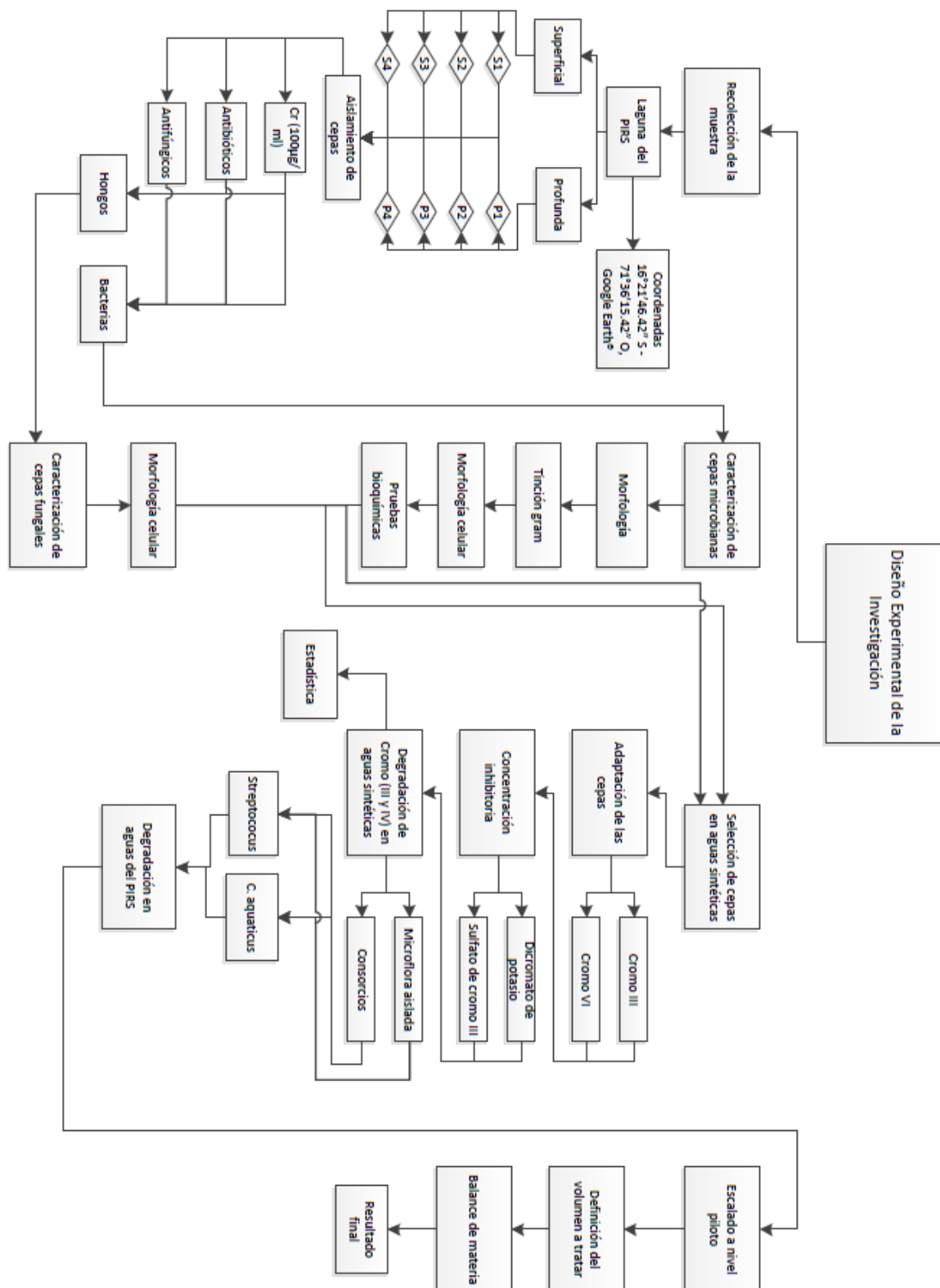
Los resultados obtenidos en la selección de la cepa óptima que permitió la máxima remoción de las especies Cr III y Cr VI así como las condiciones de operación mantenidas se utilizaron en el escalado a nivel piloto de la biorremediación de aguas residuales industriales del PIRS. Debido a que la capacidad aproximada de la laguna de oxidación es 28 000 m<sup>3</sup>. Se tomó como volumen de escalado una fracción equivalente a 1/100 de su capacidad real; esto es, 280 m<sup>3</sup> lo cual representó un cubo de 6,54 m de arista que fue configurado virtualmente con un 25% de exceso para seguridad y formación de espuma y contingencia por incremento súbito de generación de aguas

residuales. Las condiciones de operación se mantuvieron en TPS (temperatura y presión estándar) y se alimentaron virtualmente inóculos de la cepa bacteriana que mostró óptimo desempeño en la remoción de cromo. Las aguas residuales crudas alimentadas a la celda virtual mantuvieron la composición físico-química de origen y los contenidos de contaminantes utilizados resultaron ser los monitoreados con los métodos descritos anteriormente. Se obtuvo la contabilización de la acción microbiana en la depuración de aguas residuales del PIRS aplicando balances de materia con los datos suministrados por la experimentación en laboratorio.

La celda de biorremediación virtual consistió en una forma cúbica de  $350 \text{ m}^3$  con arista 7 m de acuerdo a la configuración mostrada en la Figura N°8 y su régimen de operación fue discontinuo o batch con tiempo de residencia igual a 1 día. El escalamiento fue realizado utilizando el programa MS Excel entorno Windows 7.



**Figura N°8.** Celda Virtual utilizada para la simulación de cambio de escala (350 000 litros, 280000 litros de agua residual).



## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 4.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de agua residual se obtuvieron de la Laguna de Oxidación del PIRS, localizado en el distrito de Cerro Colorado de la ciudad de Arequipa, coordenadas  $16^{\circ} 21'49.21''$  S ,  $71^{\circ}36' 25.47''$ O. La muestra fue recepcionada en frascos de vidrio de 1 L de capacidad color ámbar y presentó las características mostradas en la Tabla N°9.

**Tabla N° 9.**  
Características fisicoquímicas del agua residual

Color	Verde oscuro
Temperatura	17 °C
pH	8.6



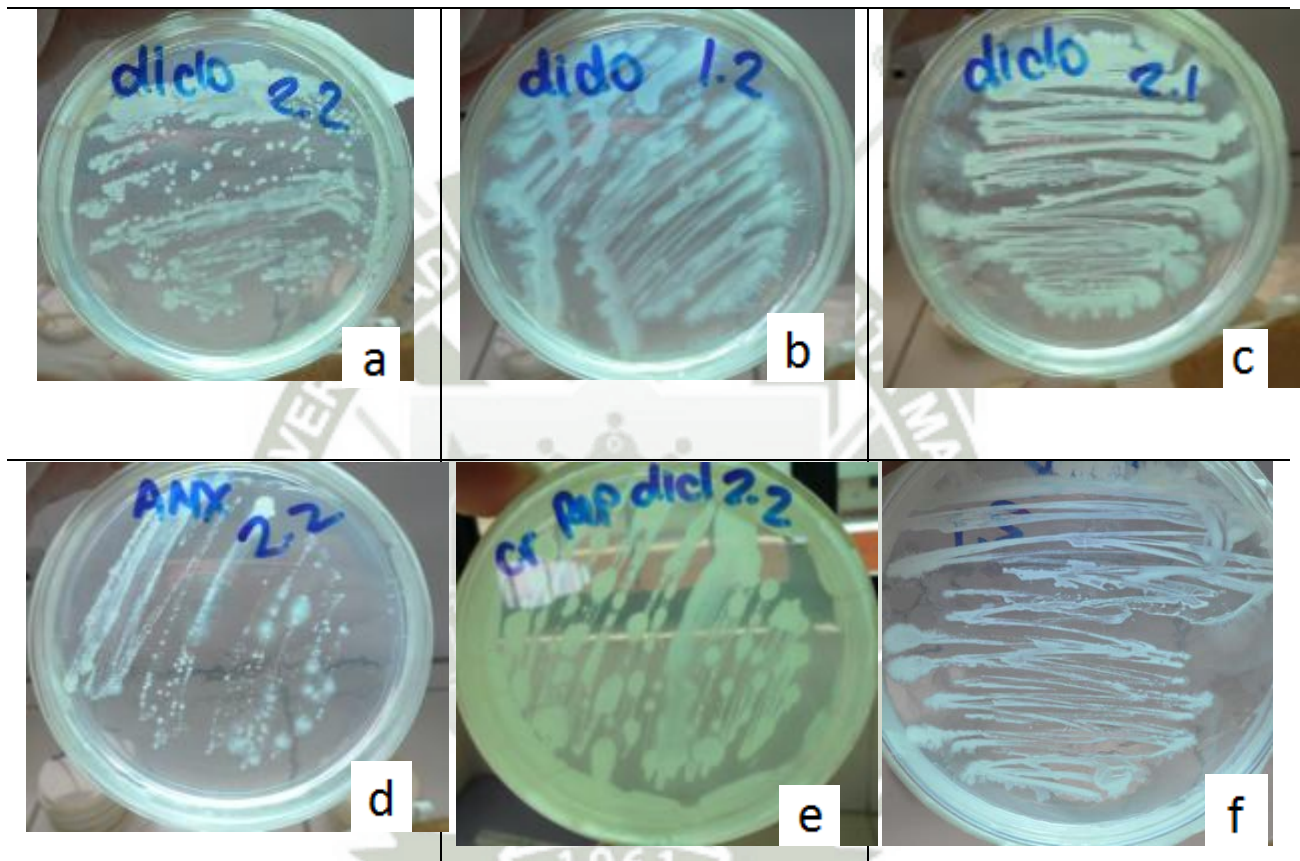
**FIGURA N°9 .**Vista Panorámica de la Laguna de Oxidación del Parque Industrial de Río Seco, Arequipa

Inaugurada en setiembre del 2004, un mes después la laguna dejó de funcionar, el olor fétido que envuelve la zona hace irrespirable el aire del lugar. Se tomaron muestras de aguas para la posterior determinación de parámetros físico-químicos y llevar a cabo los procesos de biodegradación de Cr III y VI presente en el agua residual por la microflora nativa aislada.

#### 4.2 AISLAMIENTO DE LA MICROFLORA NATIVA:

##### *Bacterias*

Se lograron aislar 6 cepas bacterianas diferentes, procedentes de las muestras recolectadas de la Laguna del Parque Industrial Rio Seco, las cuales fueron separadas en el respectivo medio de cultivo y posteriormente codificadas de la siguiente manera:



**FIGURA N°10.** Características morfológicas de las cepas nativas (a) Cepa D2.2C, (b) Cepa D1.2C, (c) Cepa D2.1C, (d) Cepa A 2.2B, (e) Cepa D2.2B, (f) Cepa D2.1B. La galería de fotos de la identificación morfológica se presentan en el Anexo N°3.

El medio de cultivo Plate Count (PC) para el aislamiento fue el adecuado ya que permitió que las cepas crecieran separadas y se facilitó de esta manera la identificación morfológica de éstas,

utilizándose el Cromo (100 $\mu$ g/ml) suplementado como método de aislamiento para poder obtener las cepas de más aceptación al metal.

Una vez que las cepas fueron separadas, éstas se duplicaron y se utilizaron los antibióticos Amoxicilina y Dicloxacilina ambos a 5 $\mu$ g/ml lo cual ayudó a purificarlas. El antibiótico Dicloxacilina fue el que mejor resultados dio para la purificación de las cepas. El antimicótico Anfotericina B utilizado obtuvo buenos resultados al no presentar contaminaciones por agentes micóticos y levaduriformes en las cepas aisladas.

### ***Hongos***

Se lograron aislar dos cepas de hongos las cuales pertenecían a las muestras correspondientes a la superficie de la laguna. No se reportó crecimiento de hongos en las muestras profundas. El medio de cultivo seleccionado, nos permitió aislar adecuadamente los hongos sin tener contaminación de levaduras ya que este medio es más selectivo. Los antibióticos Gentamicina (0.04g/l) y Cloranfenicol (0.4g/l) tuvieron un efecto parcial ya que en algunos casos como se observa en las fotografías de la Tabla N°13 sí se obtuvo contaminación por parte de bacterias.

### ***Levaduras***

No se reportó crecimiento de levaduras en las muestras tanto para las superficiales como para las profundas a pesar de que se utilizó un medio de cultivo adecuado para estas especies.

### ***Algas***

No se reportó crecimiento de algas durante el periodo de 7 días de incubación, esto se debe a que la muestra de agua residual de donde se produjo el aislamiento muestra mucha contaminación lo cual inhibe el crecimiento de estas especies.

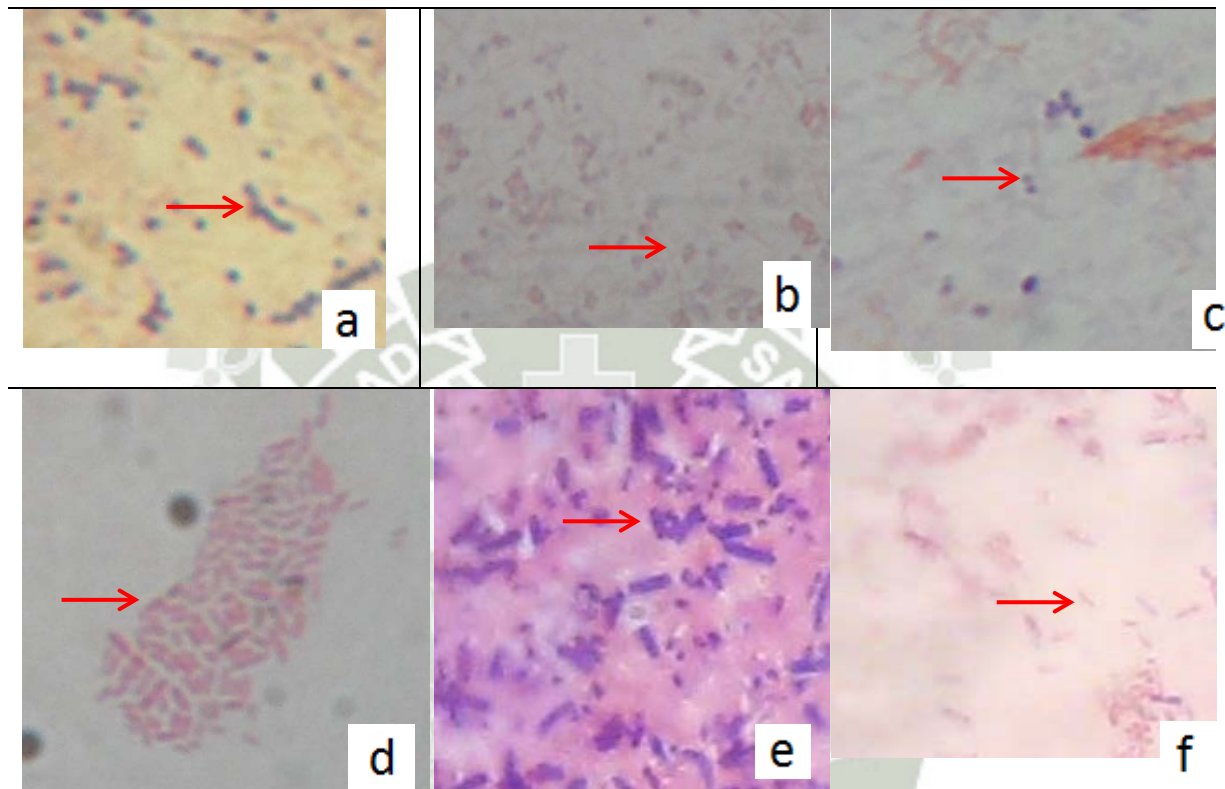
## ***4.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MORFOLOGICA DE LAS ESPECIES MICROBIOLÓGICAS AISLADAS***

### ***Bacterias***

Se identificaron cada una de las cepas aisladas mediante pruebas bioquímicas y utilizando el sistema de tablas de identificación. Todas las pruebas bioquímicas y sus resultados se presentan en la Tabla N°12.

**Resultados de la Tinción de Gram:**

A partir de las colonias completamente aisladas en el medio Plate Count se realizó la coloración GRAM respectiva de cada una de las cepas y se observó en el microscopio óptico a 100X. Los resultados observados, se presentan en la Figura N°11 .



**FIGURA N°11.** Coloración de GRAM de las cepas nativas aisladas. (a) Cepa D2.2C, (b) Cepa D1.2C, (c) Cepa D2.1C, (d) Cepa A 2.2B, (e) Cepa D2.2B, (f) Cepa D2.1B

Se realizó la tinción de GRAM como primer medio de identificación para todas las cepas aisladas, posteriormente se realizó una identificación particular para cada cepa de acuerdo a su forma celular.

**Tabla N° 10.**

Caracterización microscópica mediante Tinción GRAM de las cepas nativas aisladas

Cepa	Forma celular	GRAM
D 2.2 C	Cocos	Positivos
D 1.2 C	Cocobacilo	Negativos
D 2.1 C	Cocos	Positivos
A 2.2 B	Bacilos	Negativos
D 2.2 B	Bacilos	Positivos
D 2.1 B	Bacilos	Negativos

### Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas

La totalidad de las pruebas bioquímicas realizadas se presentan resumidas en la Tabla N°12.

- **Prueba de la Catalasa**

Los microorganismos codificados como D2.1C y D. 2.2B dieron positivo a esta prueba, mientras que los microorganismos D2.2C y D1.2C negativo. A los demás microorganismos no se le realizó esta prueba debido a que no corresponde de acuerdo a los diagramas de identificación.



**FIGURA N°12.** Ilustración de la prueba de la catalasa

- **Prueba de la Coagulasa**

El microorganismo D2.1C fue al único que se le realizó esta prueba debido a que pertenece al género de *Staphylococcus*. Esta prueba dió negativo para este.



**FIGURA N°13.** Ilustración de la prueba positiva de la coagulasa

- **Prueba de la Oxidasa**

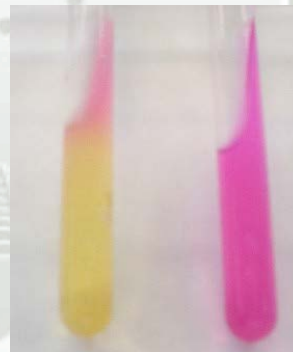
Los microorganismos a los cuales se sometieron a esta prueba fueron: D2.2C, D 1.2C, D2.1C, D2.2B, y todos tuvieron un resultado negativo lo que indica que no presentan la enzima oxidasa.



**FIGURA N°14.** Ilustración de la prueba de la oxidasa

- **Prueba de la Ureasa**

Los microorganismos sometidos a esta prueba fueron: D2.1C y D2.2B, los cuales dieron resultado positivo y negativo respectivamente, lo que indica que el microorganismo D2.1C presenta la enzima ureasa.



**FIGURA N°15.** Ilustración de la prueba de la ureasa

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

Todos los microorganismos aislados fueron sometidos a esta prueba y los resultados fueron:

D2.2C	D1.2C	D2.1B	A 2.2B	D2.1 C	D2.2B
K/A	K/K	A/A	A/A	A/A	K/K
Sólo fermenta glucosa	No fermenta azúcares	Fermenta todos los azucare	Fermenta todos los azucare	Fermenta todos los azucare	No fermenta azúcares



**FIGURA N°16.** Resultados de la prueba del TSI

- **Prueba LIA (Lysine Iron Agar ó Agar Lisina Hierro)**

El microorganismo D2.1B fue el único sometido a esta prueba la cual fue positiva para la deaminación de la lisina.



**FIGURA N°17.** Resultados de la prueba de LIA

- **Prueba MIO (Motility-Indole-Ornitine ó Motilidad-Indol-Ornitina)**

El microorganismo A 2.2B fue el único que se sometió a esta prueba la cual dió color púrpura lo que indica positivo para la ornitina descarboxilasa,...



**FIGURA N°18.** Resultados de la prueba de la Ornitina

- **Rojo Metilo**

Los microorganismos D2.2C; D2.1B; A2.2B; D2.1C; D2.2B dieron un color rojo lo que indica un resultado positivo y el microorganismo D1.2C tuvo un resultado negativo al no desarrollar color.



**FIGURA N°19.** Resultados de la prueba del Rojo de Metilo

- **Voges Proskauer**

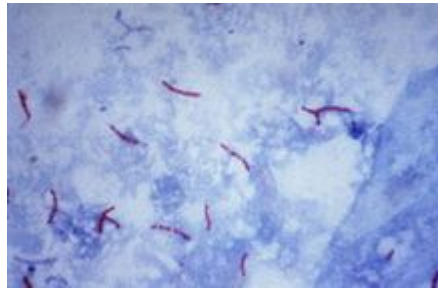
Para esta prueba, los microorganismos D2.2C; D2.1B; A2.2B; D2.1C; D2.2B no formaron color, lo cual indica un resultado negativo, mientras que el microorganismo D1.2C tuvo un resultado positivo.



**FIGURA N°20.** Resultados de la prueba del Voges Proskauer

- **Tinción de Ziehl Neelsen**

Esta prueba fue hecha únicamente para el microorganismo D2.2B, el cual dio negativo como ácido resistente.



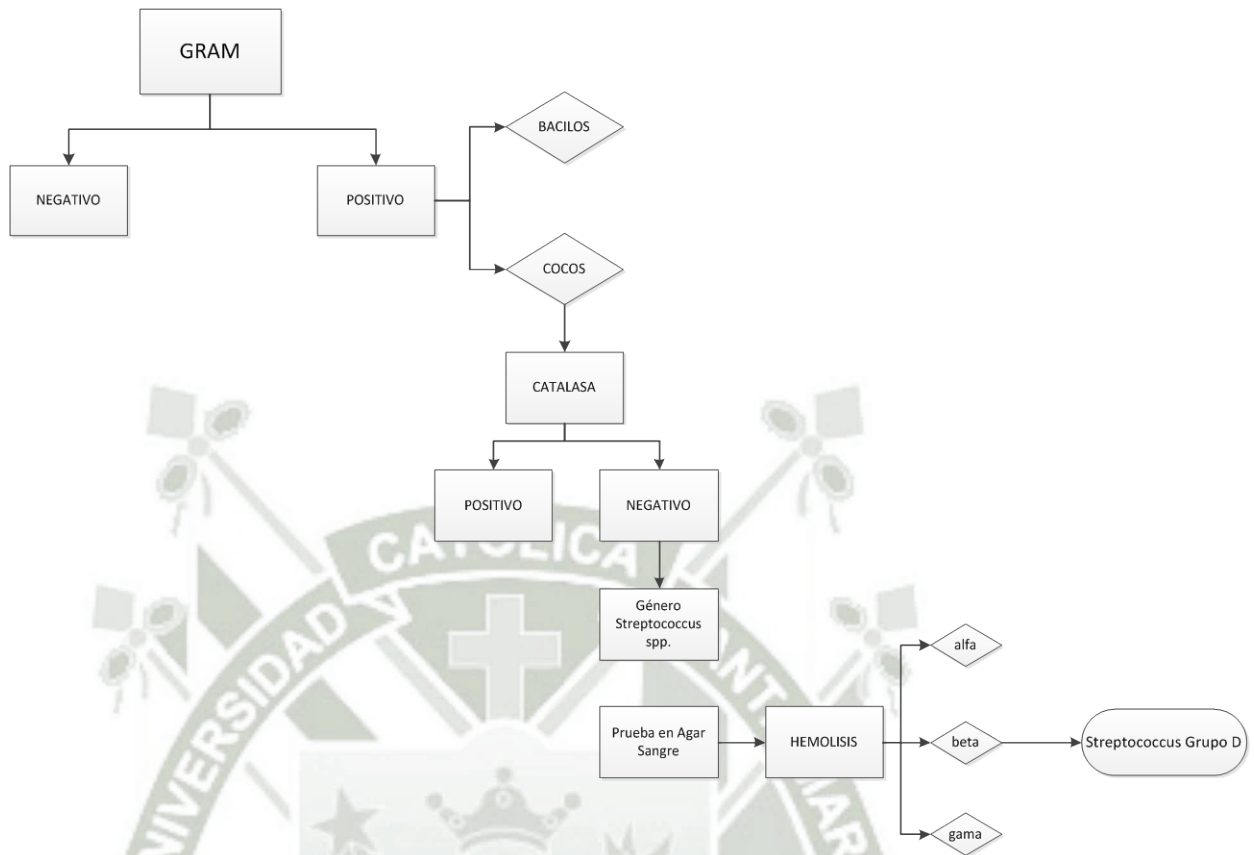
**FIGURA N°21.** Vista al microscopio de los microorganismos ácido resistentes

### Identificación bioquímica de las cepas aisladas

#### *Cepa D 2.2C*

Se inició la identificación de esta cepa con la prueba de la tinción de GRAM y al obtener un coco gram positivo se procedió a realizar la identificación mediante el Flujograma N° 1. De acuerdo a este flujograma se inició la identificación con la prueba de la catalasa la cual dio negativo, posteriormente se efectuó la prueba del crecimiento en Agar Sangre la cual nos dio un resultado de no hemolisis, por lo que descartamos a los microorganismos tales como *S. pneumoniae*, *S. viridens*, *Spयोगenes*, *S. agalactiae* y *S. anginosus* y nos quedamos con los ***Streptococcus spp.*** del grupo D.

**Flujograma N° 1:**



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

**Cepa D 1.2C**

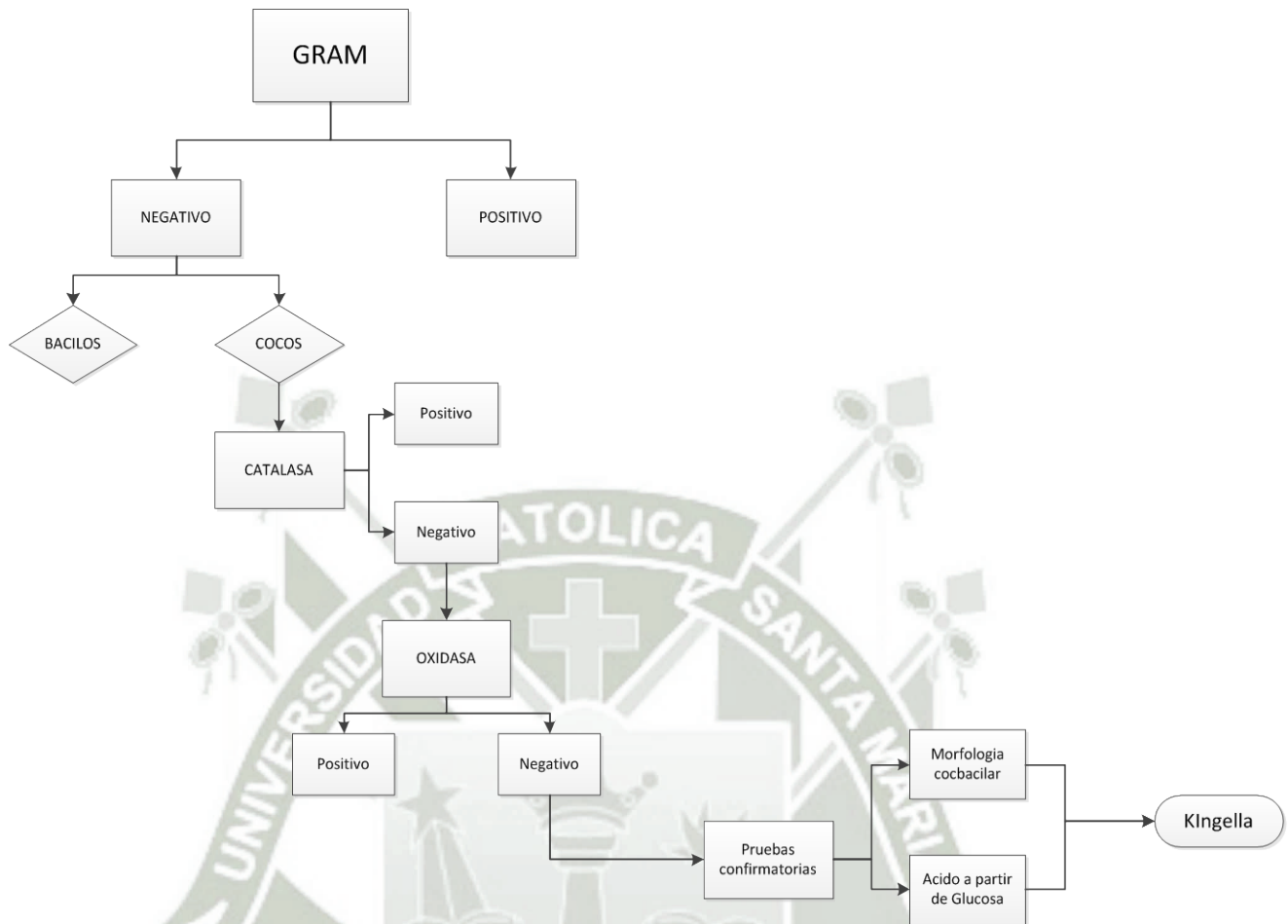
De acuerdo a la identificación preliminar de la Tinción GRAM se obtuvieron cocos GRAM negativos, utilizando el Flujograma N° 2 para la identificación de esta cepa. Este grupo de microorganismos no es extenso pero presenta cepas un poco más difíciles de identificar. La identificación se inició con las pruebas de la catalasa y oxidasa las cuales para la mayoría de microorganismos de este grupo son positivas y los microorganismos son del género *Neisseria*, incluyendo bacterias con morfología de diplococcos Gram-negativos con una reacción positiva a las pruebas de oxidasa y catalasa. Conjuntamente con los géneros *Moraxella* (incluyendo *Branhamella catarrhalis*, actualmente *Moraxella catarrhalis*), y *Kingella* conforman la familia Neisseriaceae. En este último género las pruebas de oxidasa y catalasa fueron variables. Así mismo, se descartaron las especies patógenas

primarias como *N. Conorrohoeae* y *N. meningitidis* ya que estas son nutricionalmente mucho más exigentes, por lo cual es muy poco probable que se encuentren como cepas nativas en aguas residuales quedándonos entre los géneros *Bramhamella*, *Kingella* y *Moraxella* .

Se descartaron los géneros *Bramhamella* y *Moraxella* debido a que no presentan una morfología similar a la de los cocobacilos así como también las pruebas confirmatorias de la catalasa, oxidasa y formación de ácido a partir de glucosa ayudaron a determinar que el microorganismo en cuestión se trata del género *Kingella spp.*



**Flujograma N°2:**

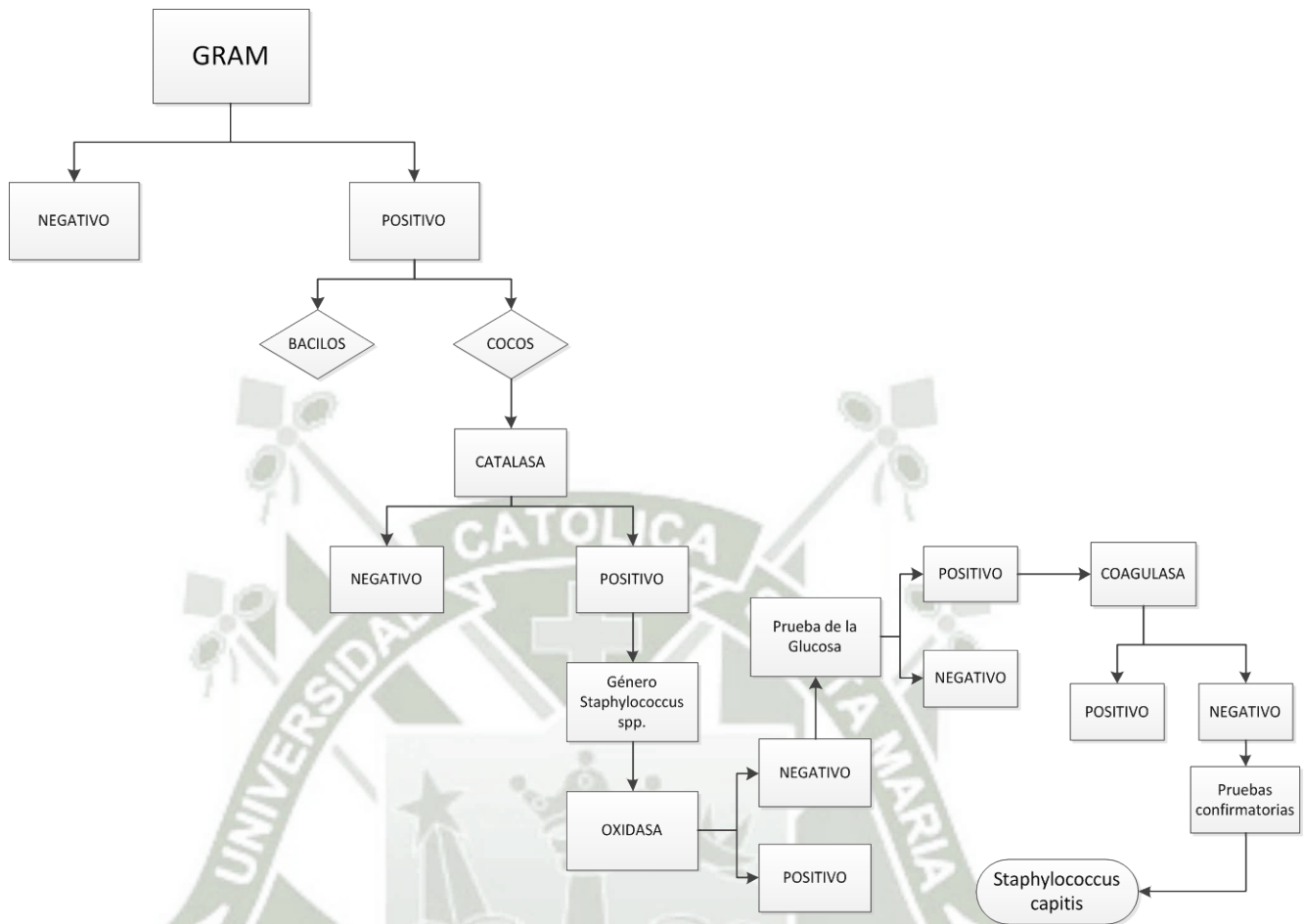


.Fuente: Jave, J.M.(2008) Guía de Microbiología

### **Cepa D 2.1C**

De acuerdo a la identificación preliminar de la Tinción GRAM se obtuvieron cocos GRAM positivos, utilizándose el Flujograma N° 3 para la identificación de esta cepa, iniciándose la identificación con la prueba de la catalasa la cual sirve para diferenciar los géneros *Streptococcus spp.* de los *Staphylococcus spp.* Para el microorganismo en cuestión esta prueba dio positiva lo cual descarta al género *Streptococcus spp.* Así mismo, se usaron las pruebas confirmatorias de Fermentación de Glucosa y oxidasa para descartar al género *Micrococcus*. Posteriormente se realizó la prueba de la coagulasa para descartar al *Staphylococcus aureus* la cual dio negativo. Se utilizaron diferentes pruebas bioquímicas confirmatorias como la fosfatasa alcalina y ureasa, las cuales confirmaron la presencia de *Staphylococcus capitis*.<sup>(65)</sup>

*Flujograma N°3*

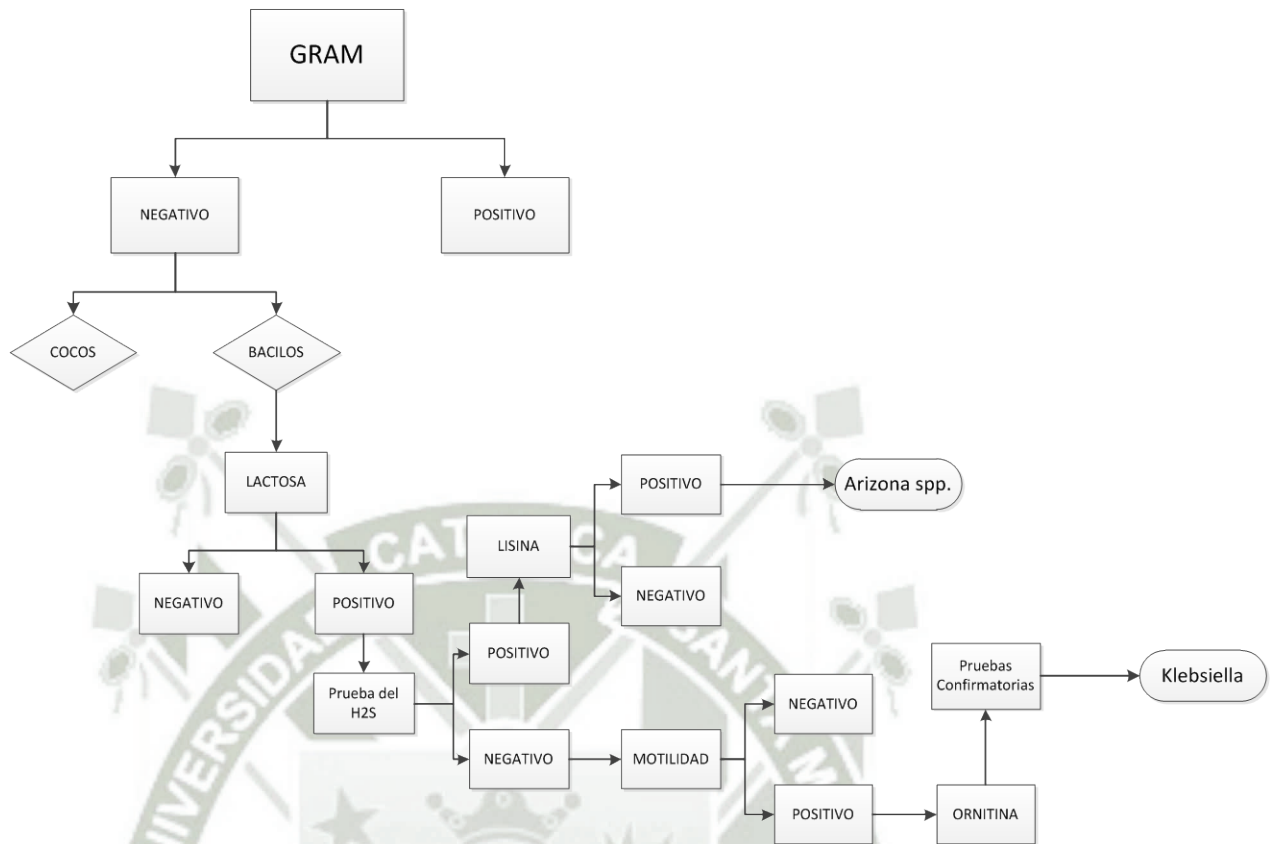


Fuente: Jean F. Mac Faddin(2000) Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica; 2. Jave, J.M.(2008) Guía de Microbiología

**Cepa A2.2B**

De acuerdo a la identificación preliminar de la Tinción GRAM se obtuvieron bacilos GRAM negativo, utilizándose el Flujograma N° 4 para la identificación de esta cepa. Se inició la identificación con la prueba de fermentación de lactosa la cual dio positiva, de ahí se procedió a la prueba de H<sub>2</sub>S dando negativo. Luego se efectuaron las pruebas de motilidad, urea, indol, VP y rojo de metilo las cuales son confirmatorias de la presencia de *Klebsiella*.

*Flujograma N°4*

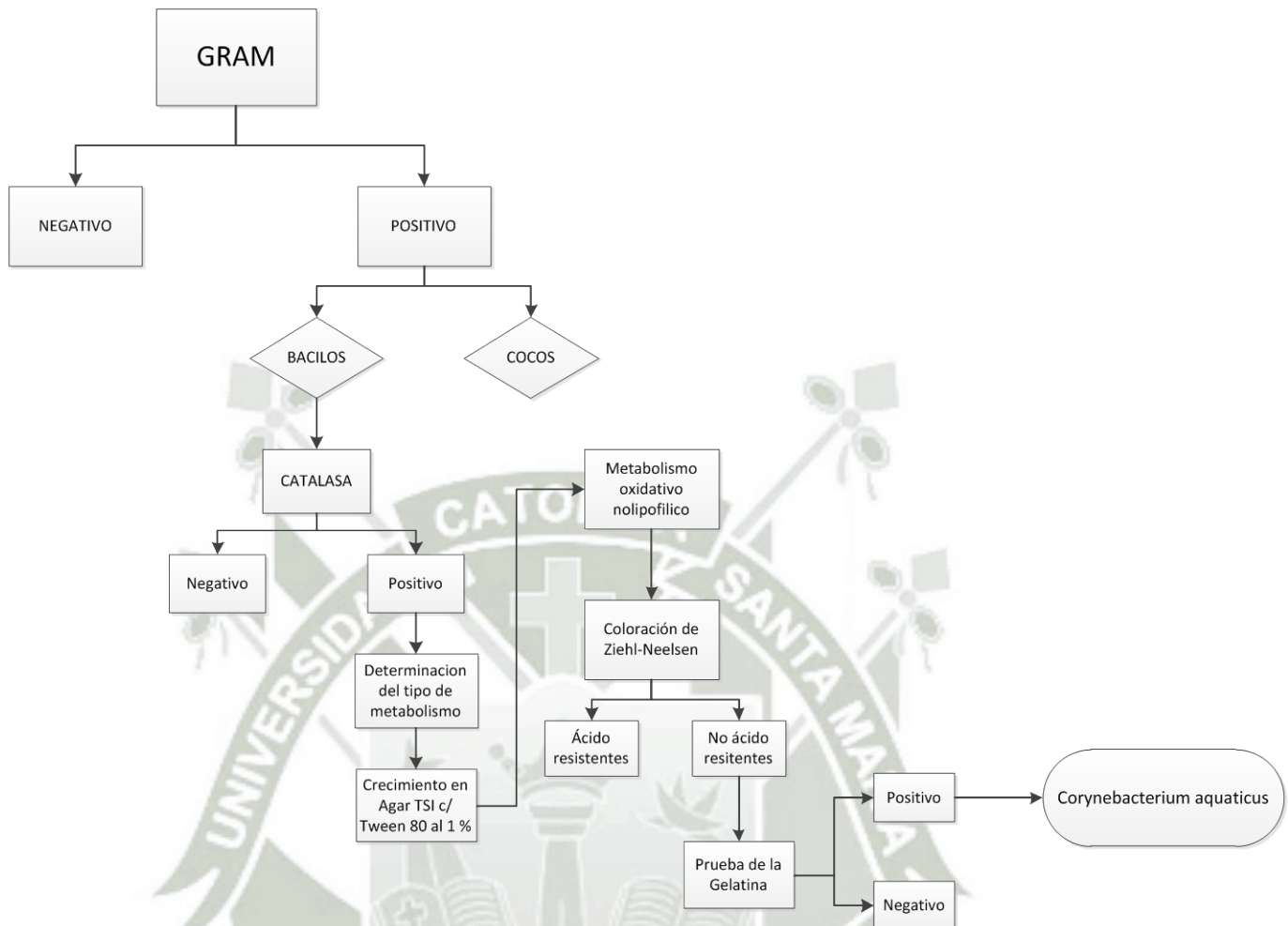


Fuente: Jave, J.M.(2008) Guía de Microbiología

***Cepa D2.2B***

De acuerdo a la identificación preliminar de la Tinción GRAM se obtuvieron bacilos GRAM positivos, se utilizó el Flujograma N° 5 para la identificación de esta cepa. Se inició la identificación con la prueba de la catalasa la cual nos permite diferenciar varios tipos de Bacilos gram positivos como *Lysterio monocytogenes*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Gardnerella*, *Arcanobacterium*, *Corynebacterium aquaticus* entre otros. Para esta prueba el microorganismo que buscamos, dio positivo, por lo cual el siguiente paso fue realizar la determinación del tipo de metabolismo (Metabolismo oxidativo Lipofílicos, Metabolismo oxidativo No lipofílico, metabolismo fermentativo (pigmentados amarillos) arrojando un metabolismo oxidativo No Lipofílico, así como bacilos no ácidos resistentes, con pigmentación amarilla, procediéndose luego a la prueba de gelatina la cual salió negativa determinándose que el microorganismo en cuestión es *Corynebacterium aquaticus*

*Flujograma N°5*



Fuente: Apuntes de laboratorio Britania. Identificación de bacilos gram positivos. ([www.brinatialab.com.ar](http://www.brinatialab.com.ar))

**Cepa D2.1B**

De acuerdo a la identificación preliminar de la Tinción GRAM se obtuvieron bacilos GRAM negativos utilizándose el Flujograma N° 4 para la identificación de esta cepa. Se inició la identificación mediante la fermentación de lactosa la cual dio positivo, de ahí se procedió a la prueba de formación de H<sub>2</sub>S la cual dio positivo, luego se efectuó la prueba confirmatoria de la degradación de Lisina la cual nos dio por resultado que el microorganismo en cuestión es *Arizona*.

A continuación presentamos una tabla resumen de la identificación de las cepas aisladas

**Tabla N°11.**

Tabla resumen de identificación de los microorganismos aislados

<b>Codificación de la Cepa</b>	<b>Microorganismo</b>
D 2.2 C	Streptococcus grupo D
D 1.2 C	Kingella
D 2.1 B	Arizona
A 2.2 B	Klebsiella
D 2.1 C	Staphylococcus capitis
D2.2 B	Corynebacterium aquaticus



**Tabla N°12.**

Resumen de las principales pruebas bioquímicas para la identificación de las especies microbiológicas aisladas


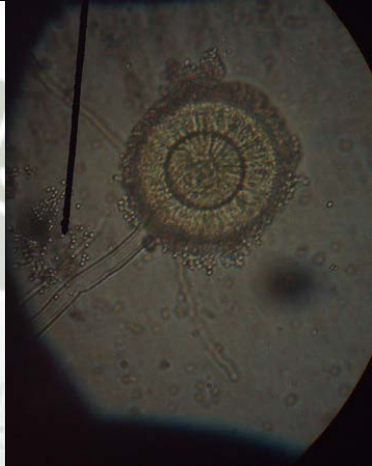
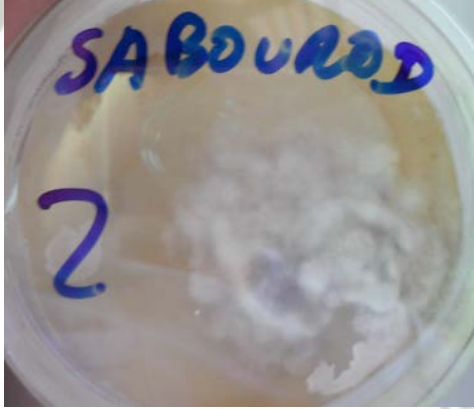

CODIGO	MORFOLOGIA	GRAM	CATALASA	H2S	OXIDASA	COAGULASA	TSI	TSIc/180	LIA	Rojo Metilo	Vogues Proskauer	Indol	SANGRE	HEMOLISIS	UREA	ZIEHL NEELSEN	MOT	MICROORGANISMO
D 2.2C	cocos	positivo	negativo	N/A	negativo	N/A	k/a	N/A	N/A	positivo	negativo	negativo	positivo	variable	N/A	N/A	N/A	Streptococcus grupo D
D1.2C	cocos	negativo	positivo	N/A	negativo	N/A	k/k	N/A	N/A	negativo	positivo	negativo	N/A	N/A	N/A	N/A	negativo	Kingella
D2.1B	bacilos	negativo	N/A	N/A	N/A	N/A	a/a	N/A	positivo	positivo	negativo	positivo	N/A	N/A	N/A	N/A	negativo	Arizona
A2.2B	bacilos	negativo	N/A	negativo	N/A	N/A	a/a	N/A	N/A	positivo	negativo	negativo	N/A	N/A	N/A	N/A	negativo	Klebsiella
D 2.1C	cocos	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	a/a	N/A	N/A	positivo	negativo	negativo	negati	negativo	positivo	N/A	negativo	Staphylococcus capitis
D2.2B	bacilos	positivo	positivo	N/A	negativo	N/A	k/k	k/a	N/A	positivo	negativo	negativo	N/A	negativo	negativo	negativo	negativo	Corynebacterium

**Hongos**

Se identificaron las dos cepas de hongos aisladas, las cuales se reportaron como del género *Penicillium*, y *Aspergillus*. La identificación se realizó únicamente mediante vista al microscopio a 40 X con KOH de acuerdo a su morfología ya que no se reportan pruebas bioquímicas de identificación para hongos.

**Tabla N°13.**

Morfología e Identificación de cepas fungales aisladas

Cepa	Morfología macroscópica	Morfología Microscópica
S1 Aspergillus		
S2 Penicillium		

#### 4.4 EVALUACION DE LA BIOSORCION DE CROMO (III Y VI) EN AGUAS SINTETICAS POR LA MICROFLORA NATIVA AISLADA

##### a) ADAPTACIÓN:

La adaptación de las cepas se realizó tanto para Cromo VI como para Cromo III debido a que, a pesar de que el Cromo VI, si bien se presenta en menos cantidad, es más contaminante, pero el Cromo III está presente en altas cantidades en la Laguna de Aguas Residuales del Parque Industrial de Rio Seco.



**FIGURA N°22.** Equipo diseñado para la adaptación de las especies microbiológicas

Las 6 cepas bacterianas nativas aisladas y seleccionadas pasaron el proceso de adaptación con Dicromato de potasio (VI) para representar al Cromo VI y Sulfato Básico para el Cromo III, dando buenos resultados ya que ninguna cepa murió durante esta etapa. Se realizó también, el proceso de adaptación con las dos cepas de hongos aisladas *Aspergillus* y *Penicillium* y ninguna de estas resistió este proceso, por lo que se eliminaron para la experimentación posterior de biosorción.

**b) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA**

**Cromo VI:**

Los microorganismos aislados y seleccionados pasaron por el proceso de la determinación de una concentración mínima de inhibición del contaminante Cromo Hexavalente. Se trabajaron con las concentraciones 5 mg/L, 50 mg/L, 150 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L y se utilizó como inhibidor al Dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ). Los resultados se muestran a continuación en la Tabla N°14

**Tabla N°14.**

Resultados de la concentración inhibitoria de Cromo VI para cada una de las cepas aisladas

Concentración	Klebsiella	Streptococcus	Kingella	C. aquaticum	S. capitis	Arizona
5 mg/l	+	+	+	+	+	+
50 mg/l	+	+	+	+	+	+
150 mg/l	+	+	+	+	+	+
250 mg/l	+	+	+	+	s/c	s/c
500 mg/l	s/c	+	s/c	s/c	s/c	s/c

s/c: Sin crecimiento

Como podemos observar el microorganismo *Streptococcus* es el más resistente con respecto a los otros cinco, mientras que los menos resistentes fueron *Arizona* y *S. capitis*; sin embargo esto no significa que estos no presenten actividad biorremediadora. Los microorganismos *Klebsiella*, *Kingella* y *Corynebacterium aquaticus* tuvieron un comportamiento similar obteniendo una inhibición de 250mg/L con respecto al contaminante en cuestión Cromo VI.

**Cromo III**

Así como también se realizó la inhibición para Cromo Hexavalente también se realizó este proceso con el contaminante Cromo III, utilizando concentraciones desde 5 mg/ml hasta 90 mg/ml utilizándose como inhibidor al Sulfato básico de cromo (III). Los resultados se muestran a continuación en la Tabla N°15.

**Tabla N°15.**

Resultados de la concentración inhibitoria de Cromo III para cada una de las cepas aisladas

Concentración	<i>Klebsiella</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Kingella</i>	<i>C. aquaticum</i>	<i>S. capitis</i>	Arizona
13 mg/ml	+	+	+	+	+	s/c
14 mg/ml	+	+	+	s/c	s/c	s/c
15 mg/ml	+	+	+	s/c	s/c	s/c
20 mg/ml	+	+	+	s/c	s/c	s/c
25 mg/ml	s/c	+	+	s/c	s/c	s/c
50 mg/ml	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c
90 mg/ml	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c

s/c: Sin crecimiento

De acuerdo a la tabla anterior se observa que la inhibición se inició con el microorganismo *Arizona* a 13mg/ ml el cual resulta ser el menos resistente de todos, mientras que los microorganismos *Corynebacterium* y *S capitis* mostraron un comportamiento similar, siendo los más resistentes al contaminante los microorganismos *Streptococcus* y *Kingella*. Además podemos ver en la tabla que la menor resistencia empieza a una concentración de 13 mg/ ml lo que equivale a 13000 ppm, mil veces más que en el comportamiento con el Cromo VI, esto debido y comprobado en la adaptación, a que las cepas muestran mayor adaptación hacia en Cromo III que para el Cromo VI ya que éste se encuentra en mayor proporción en La laguna de Oxidación de donde las cepas fueron aisladas; sin embargo esto no significa que no tengan una actividad de biosorción de Cromo VI, cuyos resultados se presentan a continuación:

### ***c) BIOSORCIÓN DE CROMO (III Y VI) EN AGUAS SINTÉTICAS***

#### ***I. DETERMINACIÓN DE CROMO HEXAVALENTE***

##### ***Determinación de los límites de detección y cuantificación***

Con el propósito de determinar las concentraciones de Cromo VI para la experimentación de la biorremediación, se utilizó la curva de calibración por triplicado, los datos se detallan en la Tabla N°16.

**Tabla N°16**

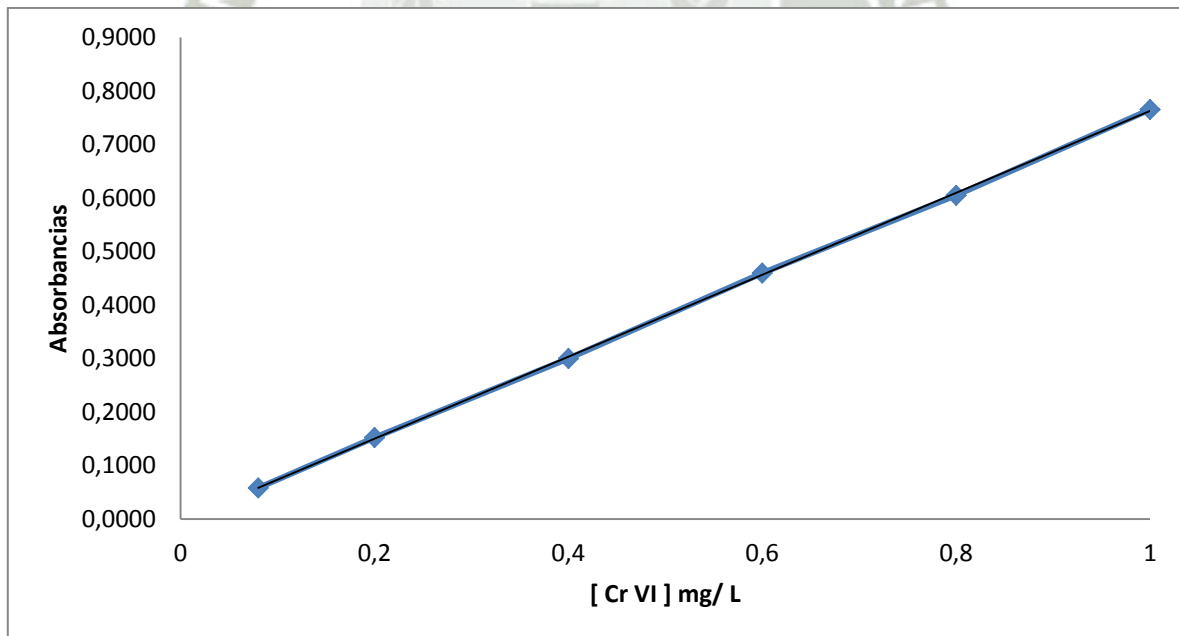
Datos para la cuantificación de Cromo Hexavalente

STD	C [ ] mg/l	Abs1	Abs2	Abs3	Promedio	Desviación Estándar
1	0.08	0.060	0.049	0.065	0.0580	0.008
2	0.2	0.150	0.158	0.149	0.1523	0.005
3	0.4	0.300	0.310	0.290	0.3000	0.010
4	0.6	0.457	0.469	0.453	0.4597	0.008
5	0.8	0.627	0.580	0.608	0.6050	0.023
6	1	0.768	0.762	0.766	0.7653	0.003

Se registraron las lecturas de las absorbancias, las cuales son mostradas en la Gráfica N°1 y luego de ser procesadas en una hoja de cálculo utilizando MS Excel, se determinó la ecuación de la recta, que hace mínimos los desvíos y que representa de mejor manera la relación de Concentración de Cr VI/ Absorbancia , representándose con la siguiente ecuación:

$$y = bx + a$$

Obteniéndose los siguientes parámetros  $a = -0.003$   $b = 0.7658$   $R = 0.9999$



**GRAFICA N°1.** Curva de Calibración para la determinación de los límites de detección y Cuantificación de Cromo Hexavalente

Extrapolando a concentración cero la ecuación de la recta se obtiene de esta forma:

$$y = 0.7658 (0) - 0.003$$
$$Y_{bl} = 0.003$$

Para el cálculo de la desviación estándar se debe construir la recta tomando como eje de las ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como eje de las abscisas las concentraciones estudiadas. De esta forma se obtiene una recta de ecuación:

$$y = 0.0044x + 0.0074$$

Se considera que la desviación estándar de las respuestas corresponde al valor de la ordenada en el origen de la recta:

$$S_{bl} = 0.0074$$

Una vez calculado los valores, se puede calcular los límites teóricos de detección y cuantificación

*Límite de Detección para el Cromo Hexavalente (LOD):*

$$LOD = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b \sqrt{n}} * 1$$

Y<sub>bl</sub>: Ruido de fondo del sistema

S<sub>bl</sub>: Desviación estándar correspondiente a la señal del blanco

b: Pendiente de la curva de calibrado obtenida al representar la respuesta del método frente a la concentración del analito

n: Número de datos

En donde después de efectuar la formula se determinó el LOD para Cromo Hexavalente

$$LOD = 0.013 \text{ mg/ L}$$

*Límite de cuantificación para Cromo Hexavalente ( LQD)*

$$LQD = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$LQD = 0.04104 \text{ mg/ L}$$

Los datos obtenidos para la cuantificación de cromo hexavalente muestran un límite de detección de 0.013 mg/L y uno de cuantificación de 0.041 mg/L, lo que indica que los valores por debajo de estas concentraciones no son detectables ni cuantificables con el método utilizado.

Los límites de detección para la cuantificación de Cromo III obtienen los mismos valores que para los del Cromo VI debido a que el método utilizado cuantifica el Cromo III indirectamente, convirtiendo éste a Cromo VI por lo que se utilizó la misma curva de calibración y por lo tanto los mismos límites de detección.

## ***II.- RESULTADOS DEL PROCESO DE BIOSORCIÓN DE CROMO VI Y CROMO III***

En el presente trabajo de investigación se evaluó la cinética de biorremediación o Biorremoción de Cromo VI y III para las cepas previamente aisladas, cumpliendo con los parámetros mencionados en la Tabla N°17 y analizando los datos posteriormente por el método espectrofotométrico.

**Tabla N°17.**

Parámetros establecidos en el proceso de biorremediación

<b>Parámetros</b>	<b>Unidad</b>
Temperatura	25°C
pH	6.7
Volumen (V)	2.5 L
Tiempo (t)	7 días

El desarrollo de las lecturas fueron hechas por triplicado, estas absorbancias sirvieron para determinar la cantidad de Cromo degradado por las cepas. La concentración de Cromo Hexavalente y Trivalente fue hallada mediante la siguiente fórmula.

$$\text{mg Cr/L} = \frac{\mu\text{g Cr} * V}{A}$$

Dónde:

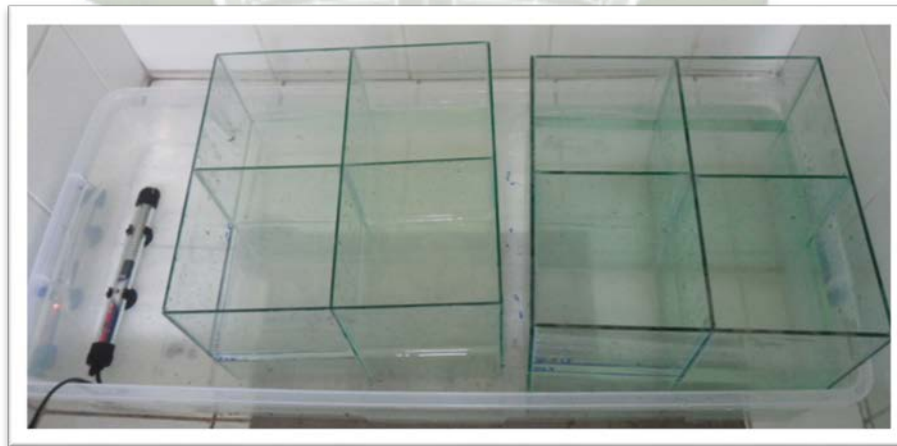
$\mu\text{g Cr}$ : Concentración de Cromo hallada utilizando la ecuación de la recta con los parámetros de la curva de calibración

V: Volumen final

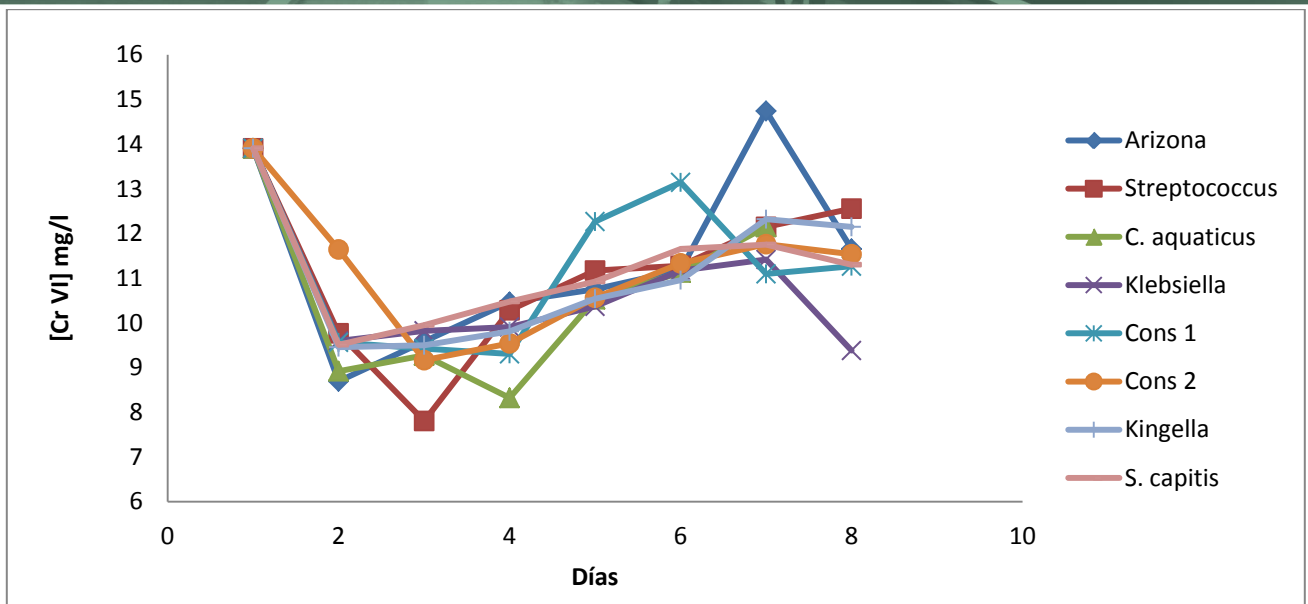
A: Volumen de la muestra

Todos los análisis hechos a través de las absorbancias demostraron ser cuantificables y detectables en su totalidad por el método empleado. La totalidad de los datos analizados para cada cepa por cada día se encuentran en el Anexo N°1.

A continuación presentamos en el **Grafico N°2** la cinética de biorremediación para las cepas bacterianas aisladas.



**FIGURA N°23.** Sistema de Biorremediación de Cromo para Aguas Residuales



\*Consortio 1: *Streptococcus* / *C. aquaticus* ; \*\* Consortio 2: *Klebsiella*, *S. capitis*

### GRAFICA N°2. Cinética de Biorremediación de Cromo VI

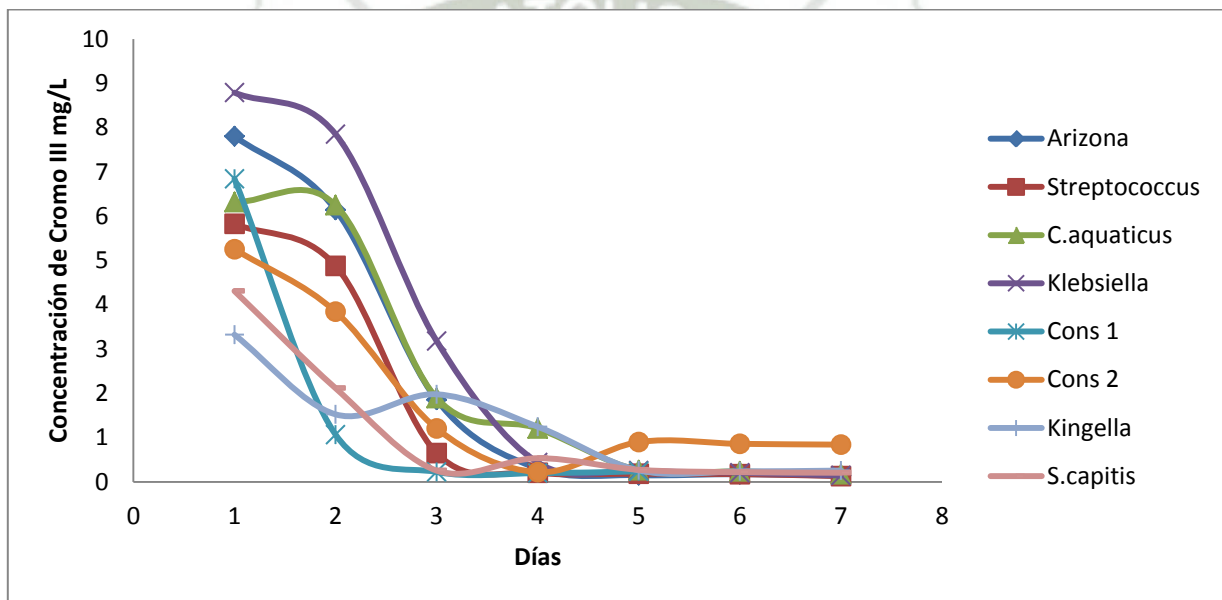
En la gráfica mostrada anteriormente podemos describir el comportamiento de las cepas hacia el Cromo VI, donde se ve que en la totalidad de cepas y sus correspondientes consorcios inician una remediación de Cromo entre el día 1 y 2, y a partir del 3er día se observa un aumento hasta el día 7. Se cree que el mecanismo utilizado por los microorganismos durante los 3 primeros días fue el de biosorción el cual explicaremos más adelante.

El proceso realizado por los microorganismos durante los días 4 al 7, en el cual se presenta un incremento, no se puede determinar con exactitud los procesos biológicos envueltos, por lo que para los análisis posteriores solo se tomaron en cuenta los datos obtenidos desde el día 1 hasta el día 3, debido a que en ese intervalo es donde se produce la biosorción.

En otros estudios realizados con el microorganismo *E. Coli* se utilizó una concentración de 20 ppm y al igual que los microorganismos aislados, se logró una remoción del 95% utilizando medio de cultivo suplementado, durante las primeras 48 horas. También en este estudio se vio que la *E. Coli* se inhibe a 200 ppm de Cromo VI, a diferencia de los microorganismos aislados, los cuales tienen una concentración inhibitoria de 150, 250 y 500 mg/l.<sup>(74)</sup> Cabe resaltar que el uso de medio de cultivo suplementado optimiza el proceso con lo que se obtiene mayor remoción del metal.

Los consorcios estuvieron representados por los microorganismos *Streptococcus /Crotynobacterium aquaticus* y *Klebsiella/ Staphylococcus capitis*. Mediante este experimento pudimos comprobar que los microorganismos realizan una mayor biorremoción de Cromo VI independientemente, no habiendo tenido una buena desempeño los consorcios utilizados ya que si analizamos el Consorcio 1 representado por microorganismos *Streptococcus /Crotynobacterium aquaticus* no tuvieron una desempeño ideal a pesar que los dos microorganismos que la integran si obtuvieron la mejor desempeño individualmente.

Por otra parte también se realizó la determinación de biorremediación de los microorganismos aislados para el compuesto Cromo III. Esta determinación se realizó con los mismos parámetros que para el Cromo VI y sus resultados se muestran a continuación:



\*Consorcio 1: *Streptococcus /C.aquaticus* ;\*\* Consorcio 2: *Klebsiella, S.capitis*

### GRAFICA N°3. Cinética de Biorremediación de Cromo III

Como podemos observar en la gráfica 3, los microorganismos realizaron una mayor remoción de Cromo III comparado con la del Cromo VI esto puede deberse a que los microorganismos en su habitat natural de donde fueron aislados, presentan mayor adaptación al compuesto Cromo III debido a que se encuentra en mayor cantidad que el Cromo VI. Además podemos observar que en el caso del Consorcio 1 tuvo mejor resultado que para el caso del Cromo VI, ya que hubo una disminución drástica de la concentración en solo dos días. Los microorganismos que conforman este consorcio son *Streptococcus /Corynebacterium aquaticus* los cuales también presentan la

mejor desempeño para el Cromo VI concluyendo que estos microorganismos son capaces de remover tanto el Cromo III y Cromo VI de las aguas contaminadas.

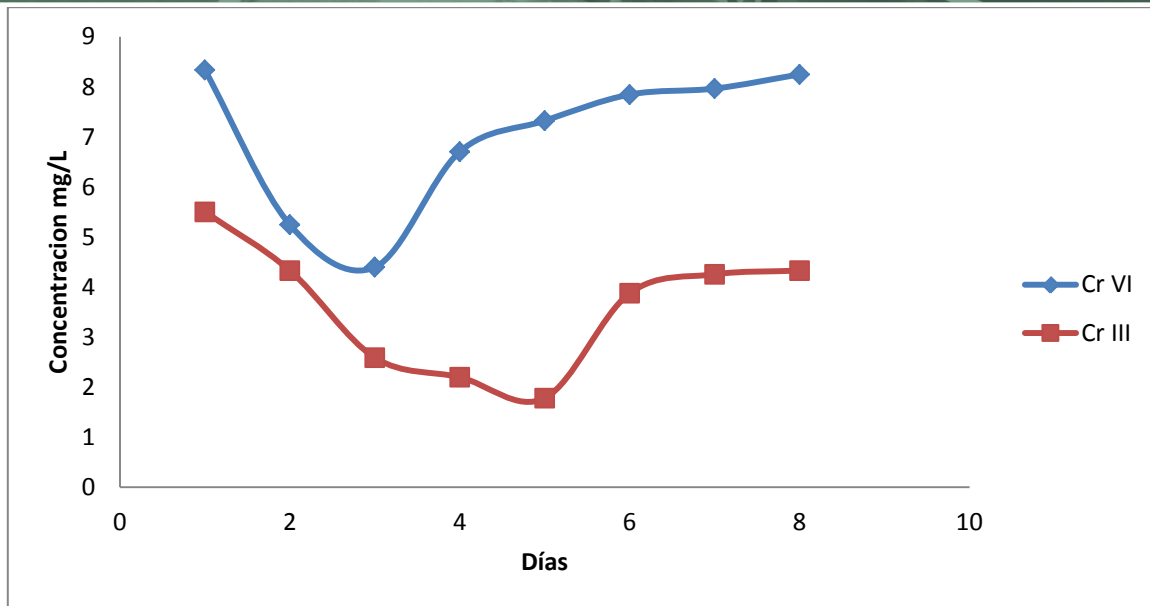
A continuación presentamos cuadro de datos de concentraciones de Cromo III obtenidos.

Finalmente, se realizó una prueba de mezcla entre Cromo Hexavalente y Cromo Trivalente utilizando los microorganismos *Kingella*, *Streptococcus*, *Corynebacterium. aquaticus* los cuales fueron los que tuvieron una mejor desempeño en la degradación de cromo en las pruebas anteriores. Los resultados se muestran a continuación:

**Tabla N°18.**

Promedio de las concentraciones de Cromo VI y Cromo III

<b>Día</b>	<b>Promedio de [Cr] VI</b>	<b>Promedio de [Cr] III</b>
0	8.335	5.501
1	5.245	4.328
2	4.396	2.588
3	6.703	2.197
4	7.323	1.780
5	7.845	3.875
6	7.965	4.253
7	8.248	4.328



**GRÁFICA N°4** Cinética de Biorremediación de mezcla de Cromo III y Cromo VI

Como podemos analizar en la gráfica N°.4 el comportamiento de los microorganismos ha variado, los microorganismos estudiados realizaron una mayor remoción de Cromo III pero en mayor tiempo, sin embargo estos microorganismos realizaron una remoción de Cromo VI en un menor tiempo. Además se observa el mismo comportamiento de un ligero aumento en las concentraciones a partir de los días 3 y 4.

Este experimento nos ayudó a predecir cómo sería el desempeño de los microorganismos en una Laguna de Aguas residuales donde estos compuestos se encuentran combinados, lo cual afecta el comportamiento de los microorganismos en su actividad remediadora.

Otros estudios analizaron el comportamiento de la *Pseudomona spp.* la cual no resultó ser eficiente para la remoción de Cromo VI pero sí para el Cromo III. Este estudio fue realizado en un periodo de 9 días y el comportamiento de dicho microorganismo, en cuanto al tiempo de remoción, fue similar a los aislados en el presente trabajo, ya que la *Pseudomona spp.* tenía mayor capacidad de remoción durante las primeras 24 horas hasta el 3er día, lapso de tiempo similar al de nuestra experimentación.

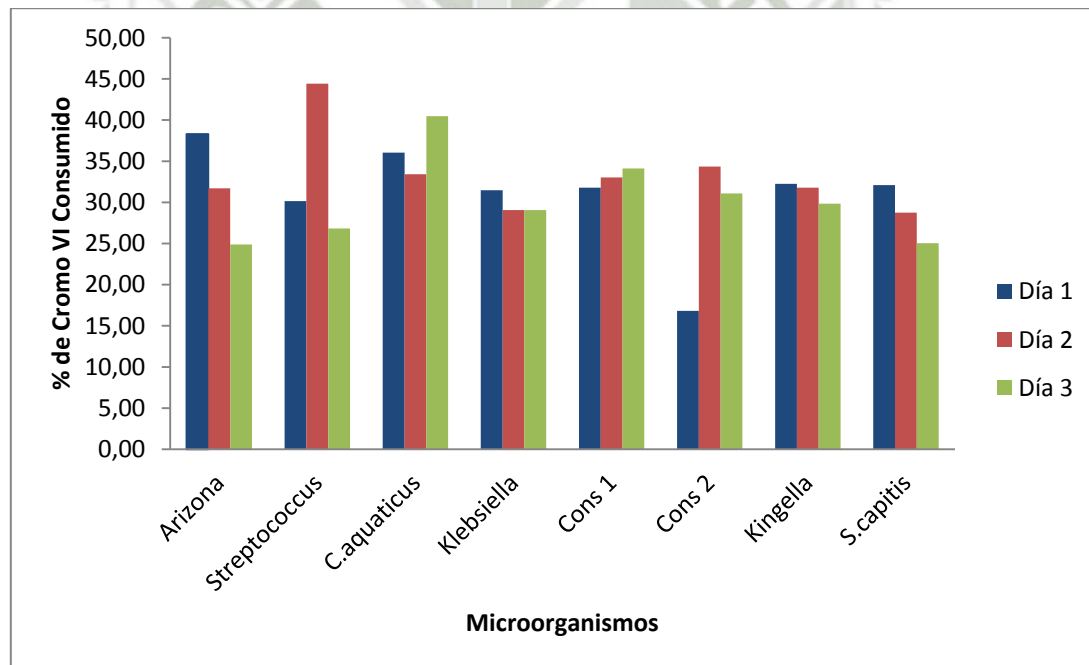
De los resultados obtenidos podemos concluir que las cepas aisladas en el presente trabajo tienen mayor capacidad de remoción tanto para Cromo VI como para Cromo III que otros microorganismos estudiados hasta el momento.<sup>(47)</sup>

**III. PORCENTAJES DE BIOSORCIÓN DE CROMO III Y CROMO VI REALIZADA POR LOS MICROORGANISMOS AISLADOS DURANTE LA EXPERIMENTACION:**

Como podemos apreciar en la Gráfica N°5 vemos que los microorganismos *Streptococcus* y *C. aquaticus* son los que tuvieron mayor remoción de Cromo VI en tres días siendo estos microorganismos los que han tenido la mejor desempeño.

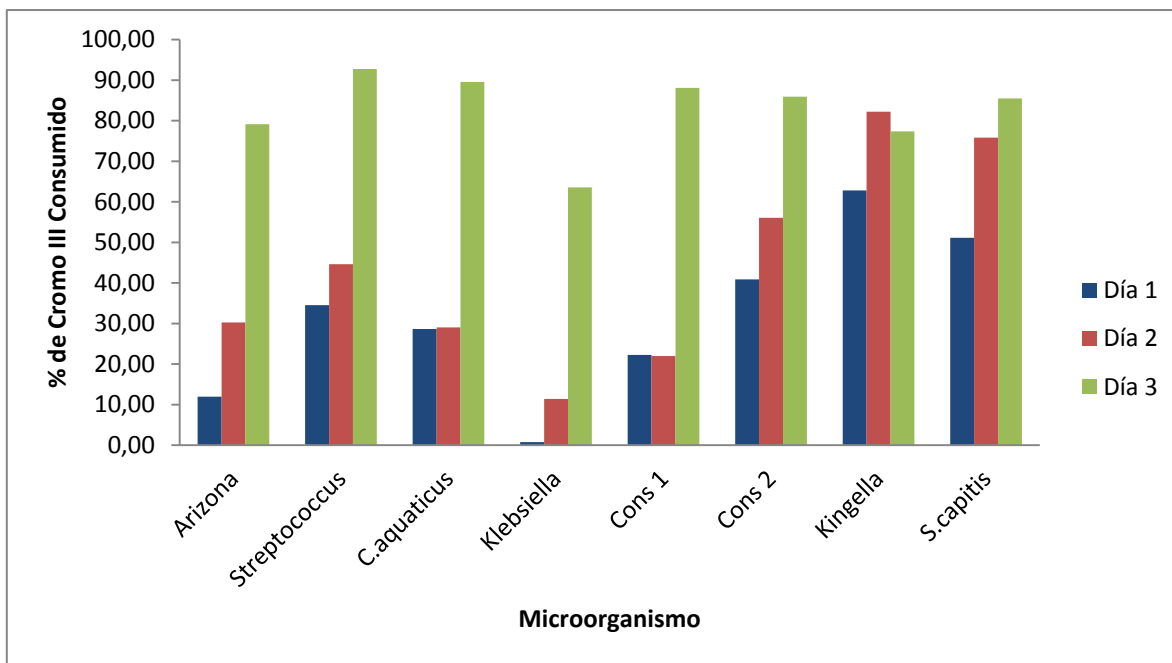
Ademas podemos observar que los microorganismos *Arizona*, *Klebsiella*, *Kingella* y *S. capitis* tuvieron su mayor remoción de Cromo VI durante el primer día y luego fue decayendo.

En el caso de *Streptococcus* éste tuvo su máximo pico de remoción en el día 2, y para el caso de *C. aquaticus* tuvo su mayor pico durante el día 3, lo que nos muestra que estos microorganismos tienen una mayor fase de adaptación y que en su fase de crecimiento es donde realizaron la remoción de Cromo VI, tal como se muestra a continuación



**GRÁFICA N°5.** Representación gráfica del Porcentaje (%) de Cromo VI removido por los microorganismos en los tres primeros días de experimentación.

Como vemos en la Gráfica N°6 los microorganismos han tenido un comportamiento muy diferente ya que en su totalidad han realizado una remoción de Cromo III en el tercer día, manteniéndose estables hasta el día 7 que finalizó la experimentación. Los microorganismos *Streptococcus* y *C. aquaticus* fueron los que tuvieron mejor desempeño de remoción de Cromo III; por el contrario el microorganismo *Klebsiella* fue el que tuvo la desempeño más deficiente, como se muestra a continuación.



**GRÁFICA N°6.** Representación gráfica del Porcentaje (%) de Cromo III removido por los microorganismos en los tres primeros días de experimentación

Por los resultados expuestos, se concluyó que los microorganismos *Streptococcus* y *C. aquaticus* son los que mejor desempeño tuvieron para la realización de la experimentación que hicimos posteriormente con aguas residuales provenientes del Parque Industrial de Río Seco.

Según otras investigaciones de biosorción de Cromo, no solo en microorganismos vivos sino también en biomasa muerta, se demuestra que los microorganismos aislados a partir de ecosistemas contaminados, retienen los metales pesados presentes en agua en tiempos relativamente cortos al entrar en contacto con soluciones de dichos metales, minimizándose así los costos en un proceso de remediación.

En dicha investigación se utilizaron concentraciones de 10, 50 y 100 mg/ l, siendo la concentración de 10mg/l la única que dio resultado ya que en las demás concentraciones los microorganismos no sobrevivieron.

A diferencia de la investigación anterior, el presente trabajo demuestra claramente que los microorganismos usados en el presente trabajo, son mucho más eficientes que los estudiados anteriormente ya que se ha demostrado su alta resistencia tanto al Cromo VI como Cromo III pudiendo los mismos trabajar en ambientes aún más contaminados. <sup>(73)</sup>



#### **4.5 EVALUACION DE LA BIOSORCION DE CROMO (III Y VI) EN AGUAS RESIDUALES CON EL CONSORCIO MICROBIANO DE MEJOR DESEMPEÑO**

Con los resultados obtenidos de la experimentación anterior, se vio que los microorganismos que obtuvieron una mayor remoción de Cromo fueron *Streptococcus* y *Corynebacterium aquaticus*. Estos microorganismos fueron evaluados para la remoción de Cromo en aguas residuales utilizando una laguna de 30 litros de capacidad. En esta experimentación se realizó la evaluación de las características fisicoquímicas del agua residual durante 4 días cuyos resultados se muestran en la Tabla N°19. Se determinó así mismo la biosorción de Cromo y otros tipos de metales presentes en el agua residual tal como se muestra en la Tabla N°20.

Al finalizar la experimentación, se pudo apreciar en forma muy objetiva los cambios a simple vista experimentados en las muestras tratadas tal como se aprecia en la Figura N°24., demostrándose ampliamente que los microorganismos utilizados actuaron eficientemente en la remediación de las aguas residuales estudiadas.



**FIGURA N°24.** A. Muestras de agua residual cruda; B: Muestras tratadas con *Streptococcus*;  
C: Muestra tratada con *Corynebacterium aquaticus*

**Tabla N°19.**

Datos de la experimentación con el multiparámetro

Unidad	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		
	Agua cruda	C. aquaticus	Streptococcus	C. aquaticus	Streptococcus	C aquaticus	Streptococcus	C. aquaticus	Streptococcus
% DO	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DO mg/l	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH	11.10	10.62	10.50	9.89	9.82	10.18	9.93	9.33	9.34
pHmV	-250.50	-216.30	-209.50	-175.40	-172.50	183.00	-169.20	-153.10	-153.30
°C	21.04	20.15	20.57	17.58	19.70	17.11	17.39	17.61	17.28
MΩcm	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
mS/cm	17.53	11.90	10.62	11.73	10.53	11.11	10.09	10.05	11.03
mS/cm2	16.21	10.80	9.73	10.08	9.36	9.44	8.63	8.64	9.41
tds mg/l	8767.00	5949.00	5310.00	5867.00	5264.00	5556.00	5047.00	5025.00	5516.00
Sal	10.37	6.82	6.03	6.73	5.98	6.35	5.73	5.70	6.30
σt	5.80	3.40	2.70	3.80	2.90	3.60	3.10	3.00	3.50
ORP	-651.30	-596.10	-602.60	-583.40	-570.30	-632.40	-611.10	-563.00	-541.10

Tal como se muestra en la Tabla N se observa una reducción de todos los valores principalmente el pH y los mS/cm<sup>2</sup> lo cual indica que los microorganismos están actuando sobre las aguas residuales. Cabe resaltar que estas condiciones fueron estándares simulando la situación real de la laguna.

Como podemos observar en la Tabla N, los valores de Cromo total y Cromo VI disminuyeron considerablemente de 5.3730 mg/L de Cromo Total a 0.31366, 0.29859 y de Cromo VI de 2.24 a 0.72 y 1.12, así como también la reducción significativa de otros metales como Ag, Al, B, Ba, Cd, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, P, SeO<sub>2</sub>, Ti.

**Tabla N°20.**

Resultados Iniciales y Finales del tratamiento con los microorganismos seleccionados

Compuesto	Concentración Inicial, mg/L	Concentración Final, mg/L	
		<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
Ag*	0.01169	<0.0005	<0.0005
Al*	0.4173	0.0345	0.0066
B*	1.613	1.553	1.455
Ba*	0.10826	0.09921	0.08966
Be*	<0.0000062	<0.0000062	<0.0000062
Ca*	>125	>125	>125
Cd*	0.000539	0.000419	0.000732
Co*	0.00061	0.00061	0.00065
Cr total*	5.3730	0.31366	0.29859
Cr VI**	2.24	0.72	1.12
Cu*	0.02032	0.00453	0.00527
Fe*	0.4119	0.1212	0.0598
K*	66.8	70.4	65.1
Li*	0.1035	0.1083	0.0969
Mg*	20.43	11.48	11.99
Mn*	0.05687	0.02085	0.01709

Mo*	0.00387	0.00497	0.000388
Na*	>125	>125	>125
Ni*	0.01760	.01557	0.01524
P*	3.027	2.147	1.990
Pb*	0.0100	0.0100	0.0052
Sb*	0.0460	0.0042	0.0025
Se*	0.0046	0.0020	0.0052
SiO2*	21.35	11.95	12.83
Sn*	0.00166	0.00786	0.01034
Sr*	0.47081	0.46068	0.041689
Ti*	0.01190	0.00177	0.00112
Tl*	<0.0014	<0.0014	<0.0014
V*	<0.00018	0.00296	0.00304
Zn*	0.14434	0.07160	0.07378

\*Método de determinación de metales y elementos traza en agua y aguas residuales por ICP-AES, revisión 4,4

\*\* Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales APHA,AWWA,WPCF, 3500 Cr Método D Pag 3-102.

En los estudios realizados para la remediación de aguas residuales utilizan mayormente biorreactores controlados para la inoculación de cepas en condiciones controladas, en donde los parámetros de pH, temperatura, agitación no han sido controlados debido a que el objetivo de la investigación era simular una situación real.

#### **4.6 APLICACIÓN A ESCALA DEL CONSORCIO MICROBIANO EN LA BIOREMEDIACIÓN VIRTUAL DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES – (ARI'S) DEL PARQUE INDUSTRIAL DE RIO SECO - PIRS.**

La cepa bacteriana que mostró óptimo desempeño en la depuración de Cromo (III) , Cromo (VI) y cromo total resultó ser *Corynebacterium aquaticus* que fue utilizada como catalizador biológico en la simulación con una concentración de 0,5 g./l. ( 14 Kg. de biomasa inicial que recibió la celda virtual ) necesario para obtener resultados halagadores. Las aguas residuales empleadas mostraron la siguiente caracterización en contenido de cromo : 2,240 ppm de Cr (VI) y 3,133 ppm de Cr (III) lo cual representó una masa inicial de este contaminante en el agua contenida en la celda virtual de 627,2 y 877,24 g., respectivamente ( 1 150,44 g. de cromo total).

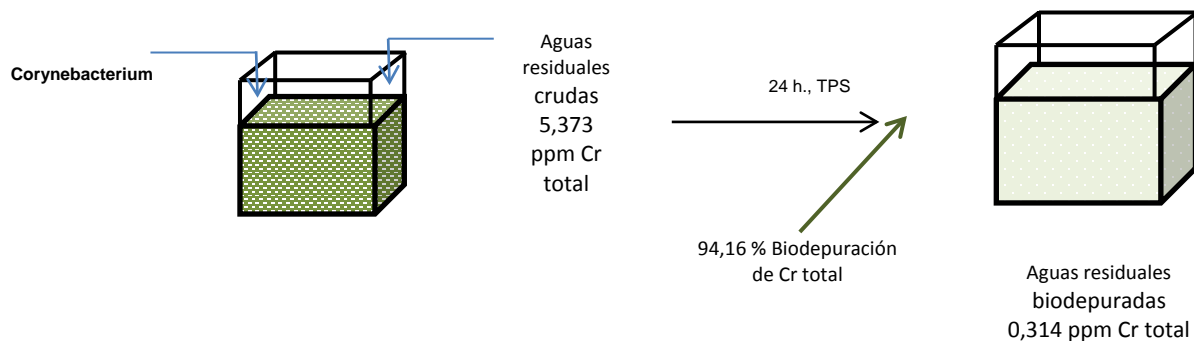
Después de 1 día de operación se observó en la experimentación una reducción en el caso empleado del 65,86% para el caso de Cr (VI) y de 100% de Cr(III); es decir, se consiguió la depuración total de la especie oxidada III.

El balance de masa aplicado en este caso resultó ser:

{ Contenido inicial de cromo total }={ Contenido final de cromo total } + { Contenido removido por acción de *Corynebacterium* }

$(280\ 000)(5,3730) = (280\ 000)(0,31366) + \{ \text{Contenido removido por acción de } \textit{Corynebacterium} \}$

De donde el contenido de cromo total removido por la especie bacteriana utilizada resultó ser de 1,4166 g. de cromo total por día de trabajo a TPS de un total de 1,5044 g. permaneciendo en solución 0,0878 g. con lo que se puede observar que de tener 100 celdas de capacidad 280 m<sup>3</sup> se conseguiría depurar completamente el contenido total de la laguna de oxidación del PIRS en un solo día de operación por debajo de los LMP's descritos en la normas vigentes (Figura N°25).



**FIGURA N°25.** Acción biorremediadora del *Corynebacterium aquaticus* en la celda virtual de 280 000 litros de capacidad real en aguas residuales del PIRS.



## CONCLUSIONES

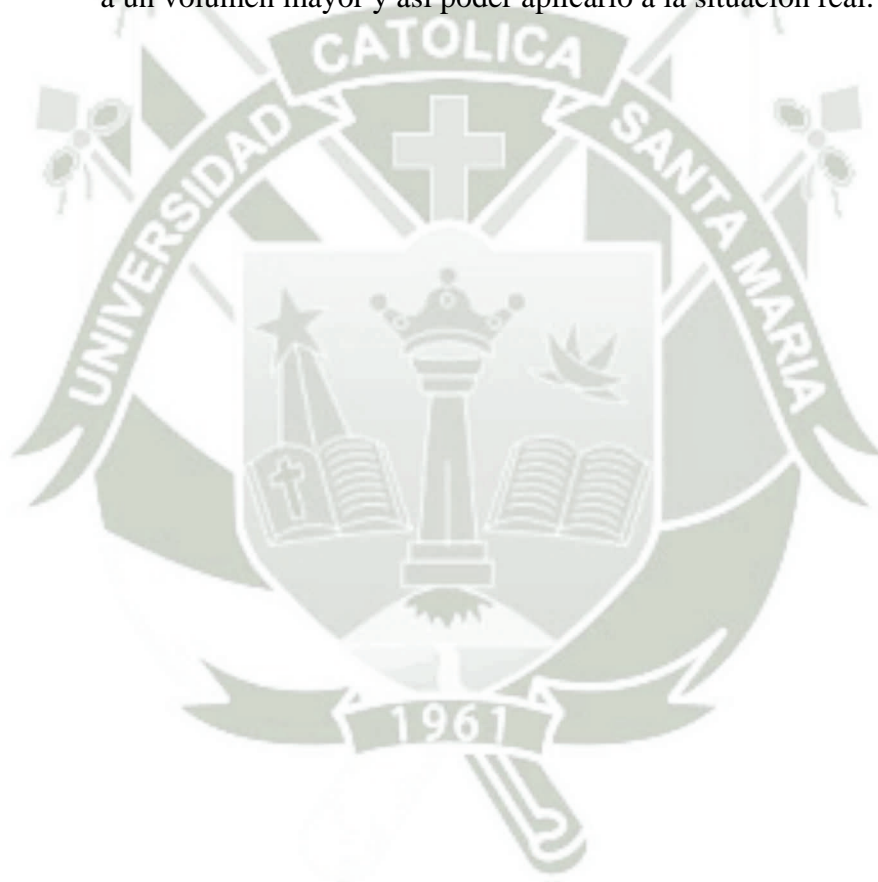
PRIMERA.- Se logró depurar parcialmente las Aguas Residuales industriales (ARI's) del Parque Industrial Rio Seco de 5.3730mg/ L de Cromo Total a 0.313 mg/L por *Corynebacterium aquaticus* y 0.298 mg/l por *Streptococcus*; y Cromo VI de 2.24 mg/l a 0.72 mg/L por *Corynebacterium aquaticus* y 1.12 mg/L por *Streptococcus* así como también otros metales presentes en el agua residual del Parque Industrial Rio Seco. Los resultados muestran una depuración considerable y con los resultados obtenidos se puede concluir que las cepas microbianas aisladas de la microflora nativa trabajan eficientemente en ARI's y se puede aplicar este método en la formulación de una planta de tratamiento en el PIRS de la ciudad de Arequipa así como también se logró demostrar la hipótesis propuesta en este trabajo.

SEGUNDA.-Se logró aislar 6 cepas bacterianas resistentes tanto a Cromo III como Cromo VI, las cuales fueron identificadas como: *Streptococcus grupo D*, *Kingella*, *Arizona*, *Klebsiella*, *Staphylococcus capitis* y *Corynebacterium aquaticus*. Así mismo se logró aislar cepas fungales de *Penicillium* y *Aspergillus* como parte de la microflora nativa de las Aguas Residuales Industriales ARI's. No se reportó crecimiento de algas y levaduras en las aguas residuales recolectadas.

TERCERA.-Se evaluó la biosorción de Cromo en aguas sintéticas donde se logró una depuración de 44.42% y 40.47 % por los microorganismos *Streptococcus* y *Corynebacterium aquaticus* respectivamente. Todas las cepas aisladas se adaptaron a la aguas residuales satisfactoriamente, así como también presentaron una alta resistencia al Cromo (III y VI) Las cepas fungales aisladas no resistieron el proceso de adaptación e inhibición por lo cual no fueron seleccionadas para la Biosorción de Cromo tanto en aguas sintéticas como aguas residuales.

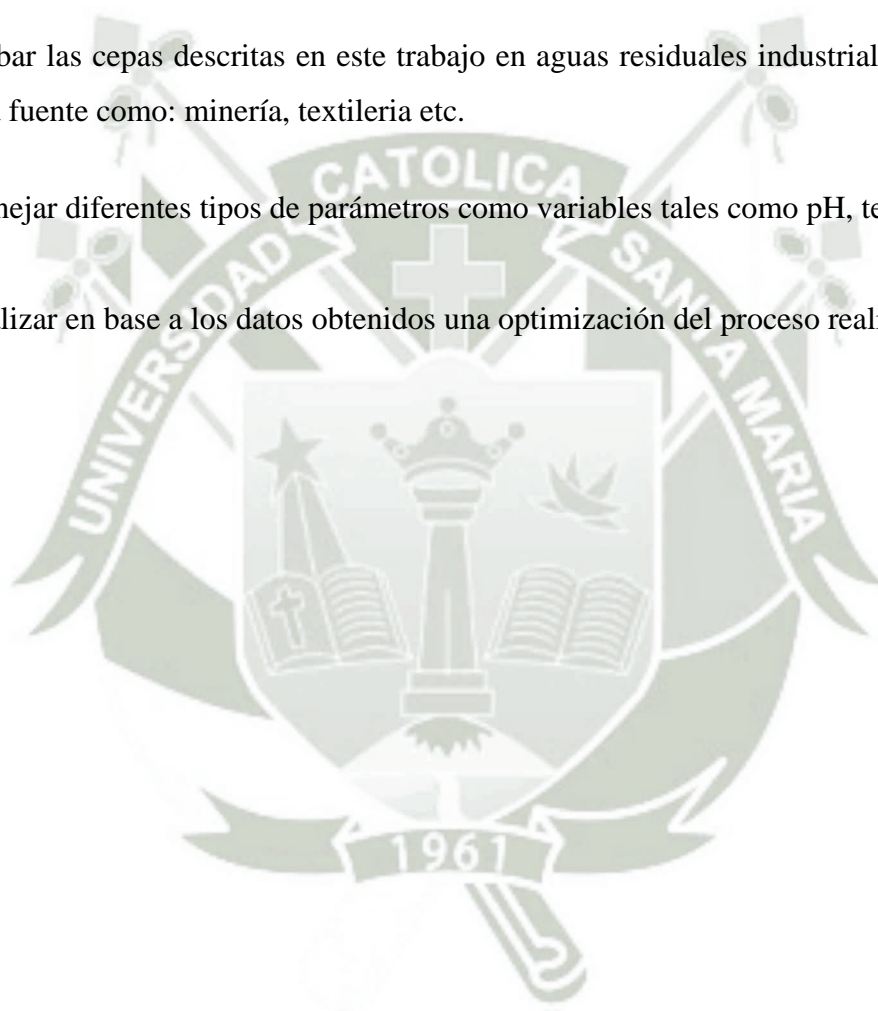
CUARTA.-Se seleccionaron a los microorganismos *Corynebacterium aquaticus* y *Streptococcus* como los de mejor desempeño y lograron depurar el 94 % de Cromo Total, así como el 68 % del Cromo VI y otros metales contaminantes presentes en el agua residual del Parque Industrial Rio Seco.

QUINTA.-Se consiguió elaborar una simulación virtual dividiendo de la laguna del PIRS a 1/100 en una forma cúbica de 350 m<sup>3</sup> con arista 7 m de acuerdo a la configuración mostrada y régimen de operación discontinuo o batch con tiempo de residencia igual a 1 día, pudiendo demostrar que la metodología utilizada junto con los microorganismos aislados con capaces de ser escalados a un volumen mayor y así poder aplicarlo a la situación real.



## RECOMENDACIONES

- Realizar una secuenciación molecular de las cepas de la microflora nativa con el objetivo de encontrar una mutación genética la cual genera la resistencia a metales como el Cromo.
- Utilizar estos microorganismos para la remediación de otros metales presentes en aguas residuales.
- Probar las cepas descritas en este trabajo en aguas residuales industriales procedentes de otra fuente como: minería, textilera etc.
- Manejar diferentes tipos de parámetros como variables tales como pH, temperatura, etc.
- Realizar en base a los datos obtenidos una optimización del proceso realizado.



**BIBLIOGRAFIA**

1. Propiedades fisicoquímicas del Cromo - <http://elementos.org.es/cromo>
2. Goldfrank's. F (2006) Toxicologic Emergences. Editorial McGraw Hill. 8th Edition. USA.
3. Córdoba, D. (2006) Toxicología. 5a. Edición. Medellín. Colombia.
4. Olson, K. R. (2007) Poisoning and Drug Overdose. Lange Clinical Manual. 5th Edition. USA.
5. Casarett and Doull's (2004) Toxicology: The Basic Science of Poison: Toxic effects of Metals. Editorial McGraw-Hill. 7th Edition. USA. <http://www.encolombia.com/medicina/Urgenciastoxicologicas/Cromo.htm>
6. Lilia A. Albert Sociedad Mexicana de Toxicología A.C Xalapa, Mexico
7. M. C. Riva; R. Flos; M. Crespi; J. Balasch Instituto de Investigación Textil. Cooperación Industria
8. Lee S.E, Lee J.U, Lee J.S, Chon H.T (2006); Effects of indigenous bacteria on Cr (VI) reduction in Cr-contaminated sediment with industrial wastes.
9. Monge-Amaya Onofre, Valenzuela-García Jesús, Acedo-Félix Evelia, Certucha-Barragán María T. y Almendariz-Tapia Francisco J. (2008). Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (Clinoptilolita); Rev. Int. Contam. Ambient.
10. Vullo D. (2003); Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del Medio Ambiente, Química Viva, Universidad de Buenos Aires, Argentina
11. Gutiérrez F. y C. Cervantes; Interacciones microbianas con el Cromo: mecanismos y potencial biotecnológico; Año 3, Núm. 37. 21-36.
12. Villegas L, Fernandez P, Amoroso M, C de Figueroa L (2008); Chromate removal by yeasts isolated from sediments of a tanning factory and a mine site in Argentina; Biometals.21. 591-600.
13. Muneer B, Rehman A, Shakoori F, Shakoori A; (2009); Evaluation of consortia of microorganisms for efficient removal of hexavalent chromium from industrial wastewater; Bull Environ Contam Toxicol. 82. 597-600

14. Sannasi P, Kader J, Ismail B.S & Salmijah S (2006) ; Sorption of Cr(VI), Cu(II) and Pb(II) by growing and non-growing cells of bacterial consortium; *Bioresource Technology*. 97. 740–747.
15. Chirwa Evans y Wang Yi-Tin (2000); Simultaneous chromium (VI) reduction and phenol degradation in an anaerobic consortium of bacteria, *Elsevier Science*, Vol 34, No.8. 2376-2384.
16. Yun-Guo Liu, Wei-Hua Xu, Guang-Ming Zeng, Xin Li, Hui Gao (2006); Cr (VI) reduction by *Bacillus* sp. Isolated from chromium landfill; *Process Biochemistry* 41. 1981-1986.
17. Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano DS N° 031-2010-SA. DIGESA
18. Silver, S. And Misra, T., (1988) Plasmid-mediated Heavy Metal Resistances. *Annual Reviews on Microbiology* 42: 717-43.
19. Lovley, D.R., (2000) *Environmental Microbe-Metal Interactions*, American Society for Microbiology, Washington D.C.
20. Jianlong, W., Xinmin, Z., Decai, D., Ding, Z., (2001). Bioadsorption of lead (II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology* 87:273-277.
21. Liu, Y., Xu, H., Yang, S., Tay, J., (2003). A general model for biosorption of Cd, Cu, and Zn by aerobic granules. *Journal of Biotechnology* 102:233-239
22. Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W., Garg, S.K., (2002) Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* 48: 427-435.
23. Tangaromsuk, J., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., (2002). Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. *Bioresource Technology* 85: 103-105.
24. Bréant, D., Jézéquel, K., y Lebeau, T, (2002) Optimisation of the cell release from immobilised cells of *Bacillus simplex* cultivated in culture media enriched with Cd<sup>2+</sup>: influence of Cd<sup>2+</sup>, inoculum size, culture medium and alginate beads characteristics. *Biotechnology Letters* 24: 1237-1241.

25. Lebeau, T., Bagot, D., Jézéquel, K. y Fabre, B., (2002) Cadmium biosorption by free and immobilised microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture. *The Science of the Total Environment* 291: 73-83.
26. McEldowney, S., (2000) The Impact of surface attachment on cadmium accumulation by *Pseudomonas fluorescens* H2. *FEMS Microbiology Ecology* 33:121-128.
27. Vullo, D., Ceretti, H., Ramírez, S., Zalts, A., (2003). Retención de metales en gel de alginato de calcio. VI Reunión Anual de SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Latinoamérica, 20 al 23 octubre, Buenos Aires, Argentina
28. Yakup Arica, M., Kacar, Y., Genc, O., (2001). Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-Alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from aqueous solution. *Bioresource Technology* 80:121-129
29. Sari, A., Tuzen, M (2008). Biosorption of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution using green alga (*Ulva lactuca*) biomass. *Journal of Hazardous Materials*, 152: 302-308
30. Lowe, B., Shiva Prakash, N., Way, M., Mann, M., Spencer, T., & Boddupalli, R. (2009). Enhanced single copy integration events in corn via particle bombardment using low quantities of DNA. *Transgenic research*, 18, 831-840.
31. Sanjay K. Sharma, Ackmez Mudhoo (2010). *Green Chemistry for Environmental Sustainability*.
32. Gadd, G.M., (2000). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 271-279.
33. Sharma, P.K., Balkwill, D.L., Frenkel, A. and Vairavamurthy, M.A., (2000). A new *Klebsiella planticola* Strain Grows Anaerobically at High Cadmium Concentrations and Precipitates Cadmium Sulfide. *Applied and Environmental Microbiology* 66(7): 3083-3087.
34. Wang, C.L., Michels, P.C., Dawson, S.C., Kitisakkul, S., Baross, J.A., Keasling, J.D. and Clark, D.S., (1997). Cadmium Removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in Aerobic Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 63(10): 4075-4078.
35. Benegas LI, R.C (2011). Determinación de las condiciones óptimas para la absorción de Cromo VI de lechos acuosos utilizando la cáscara de *Cicer arietinum* (garbanzo) Arequipa.

36. Stasinakis A.S., Thomaidis N.S., Mamais D., Karivali Marianna y Lekkas T.D. (2003). Chromium species behaviour in the activated sludge process. *Chemosphere* 52, 1059-1067
  
37. Remoción biológica de cromo hexavalente en reactores batch de barros activados: efecto tóxico de la concentración del metal en el metabolismo microbiano A. Micaela ferro orozco, edgardo m. Contreras, noemí e. Zaritzky centro de investigación y desarrollo en criotecnología de alimentos (cidca). la plata, argentina.
  
38. Tratamiento de biorremocion de Cromo  
[http://www.ing.uchile.cl/~iq54a/apuntes/19\\_cromo/19\\_cromo.html](http://www.ing.uchile.cl/~iq54a/apuntes/19_cromo/19_cromo.html)
  
39. C. Rodriguez, J. A; Perez, , m gutierrez (2002) Remocion y recuperacion de cromo III de soluciones acuosas por biomasa revisa mexicana de ing química.
  
40. Madigan M, Martinko J (editors) (2005). Brock Biology of Microorganisms (11th edición). Prentice Hall.
  
41. Roh; Choi; Li; Jin; Je, JY; MS; BR; YH (2007). «Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control». *Journal of microbiology and biotechnology*.
  
42. Ward, PG, M Goff, Donner M, W Kaminsky, O'Connor KE. (2006) A dos pasos quimio-biotecnológica de conversión de poliestireno a un termoplástico biodegradable. *Environmental Science and Technology* 40
  
43. Amer GA, Utkhede RS. (2000) Desarrollo de formulaciones de agentes biológicos para el manejo de la pudrición de la raíz de la lechuga y el pepino. *Can J Microbiol*.
  
44. Validov S, Kamilova F, S Qi, D Stephan, JJ Wang, N Makarova, Lugtenberg B. (2007) Selección de bacterias capaces de controlar *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en sustrato de lana de roca. *J Appl Microbiol*. 102 (2) :461-71. PMID 17241352
  
45. Hurtado, MP; de la Parte, MA; Brito A (Julio 2002). Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. (HTML). *Rev Soc Ven Microbiol (Venezuela: Scielo)* 22 (2):
  
46. Ramirez.D.M, Riveros.H., Campos.J., Cervantes. C. (2009) Reduccion Bacteriana de Cromo Hexavalente: Mecanismos y Aplicaciones. *Revista de Educacion Bioquímica Vol 28 Num 3 Pag 73-79. México*

47. Otiniano.G.M, Tuesta.C.L, Robles C.H, Lujan V.M, Chavez C.M (2007) Biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas sp* y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*. Rev. Med Vallejana Vol 4 N 1 pag 32-42.
48. Barrionuevo. M, Daniel. M.A, Garavaglia. L, Méndez. N et al (2009) Tratamiento biológico de efluentes industriales con contenido en metales: factores a tener en cuenta para un diseño eficiente. Revista Química Viva Num 2 Año 8.
49. Collins, M. D. & Cummins, C. S. (1986). Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896, 350AL. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp. 1266–1276. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
50. A. F. Yassin, R. M. Kroppenstedt and W. Ludwig (2003) *Corynebacterium glaucum* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol
51. Keddie, R. M. & Cure, G. L. (1977). The cell wall composition and distribution of free mycolic acids in named strains of coryneform bacteria and in isolates from various natural sources. J Appl Bacteriol 42, 229–252.
52. Myndi, Perrilla (2002) Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo
53. Rojas, Norma, Bacteriología clínica, 2006, facultad de microbiología, Universidad de Costa Rica.
54. Valls, M., Atrian, S., de Lorenzo, V. & Fernandez, L.A. (2000). Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. Nature Biotechnology: 18,661-665
55. Cava. F del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa CSIC, Ochoa [www.catalunyavanguardista.com/catvan/?p=17490](http://www.catalunyavanguardista.com/catvan/?p=17490)
56. Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed. edición). McGraw Hill.
57. Garg et al., 2007. Bioremediation technology. Recent advances. pag 124
58. Di N. Maria P.; Cordon Gabriela (2003). Biorreducción e inmovilización in situ de cromo (VI) en suelos.

59. Kotrba P., Mackova M. (2011). Microbial biosorption of metals.
60. Sala OE, Lauenroth WK, McNaughton SJ., (1995). Temperature grasslands. Global biodiversity Assessment. Cambridge (UK)
61. Bergey, David H.; John G. Holt; Noel R. Krieg; Peter H.A. Sneath (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.). Lippincott Williams & Wilkins
62. Madigan, MT; Martinko J, Parker J (2004). Brock Biology of Microorganisms (10th ed.). Lippincott Williams & Wilkins
63. Thomas D. Brock, Michael T. Madigan(1993) Microbiología. México ; Englewood Cliffs : Ed. Prentice Hall Hispanoamericana ( 2da edición en español ed) McGraw-Hill
64. SEBHATU, Mineab, KIFLOM, Bahlbi, SEYOUM, Melles et al(2007). Determining the burden of tuberculosis in Eritrea: a new approach. Bull World Health Organ, vol. 85, no. 8 pp. 593-599.
65. Jean F. Mac Faddin (2000) Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica 3era Edición. Ed Panamericana
66. Panigatti.M.C , Griffa. C, Bogleione,R, Gentinetta.F, Cassina. D.(2012) Uso de Escherichia coli para biorremediación de efluentes contaminados por cromo (VI). Avances en Ciencias e Ingeniería - ISSN: 0718-8706.
67. Lovley, D.R. (2000). Fe(III) and Mn(IV) reduction. In Environmental Microbe–Metal Interactions. Edited by D. R. Lovley. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 3-30.
68. Wang, Y.-T. & Shen, H. (1995). Bacterial reduction of hexavalent chromium. Journal of Industrial Microbiology: 14, 159-163
69. Tobin, J.M. & Roux, J.C. (1998). Mucor biosorbent for chromium removal from tanning effluent. Water Research: 32, 1407-1416.
70. Lee, D.-C., Park, C.-J., Yang, J.-E., Jeong, Y.-H. & Rhee H.-I. (2000). Screening of hexavalent chromium biosorbent from marine algae. Applied Microbiology & Biotechnology: 54, 445-448.
71. Recuperación de Cromo y su reuso en curtiembres (2004) – Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear – IBTEN, Centro de Investigaciones Nucleares.

72. Febrianto J., Kosasih AN., Sunarso J., Ju YH. , Indraswati N., Ismadji S., (2009),  
Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A  
summary of recent studies, *Journal of Hazardous Materials* 162, 616–645
73. Guevara, AS, (2010) Biorremoción de cromo (Cromo total y Cromo VI) en agua sintética  
por dos inóculos bacterianos nativos compuestos, a escala de laboratorio
74. Panigatti M C., Griffa C (2011).; uso de *Escherichia coli* para biorremediación de  
efluentes Contaminados por Cromo (VI),



## ANEXOS

### ANEXO N° 1: DATOS DE CONCENTRACION DE CROMO III Y VI POR DIA EN AGUAS SINTETICAS.

Este anexo presenta las concentraciones de Cromo (III y VI) en cada día de la experimentación con los microorganismos en el proceso de depuración en aguas sintéticas.

**Tabla N°21.**

Datos de concentración de Cromo VI obtenidos de la Biosorción por los microorganismos aislados

Microorganismo	Días							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Arizona	14.038	8.661	9.587	10.544	10.755	11.184	14.743	11.656
Streptococcus	14.038	9.804	7.802	10.272	11.173	11.281	12.149	12.556
C. aquaticus	14.038	8.977	9.347	8.357	10.530	11.130	11.463	12.149
Klebsiella	14.038	9.619	9.956	9.956	10.369	11.173	11.420	9.383
Consortio 1	14.038	9.576	9.401	9.249	12.267	13.146	11.098	11.270
Consortio 2	14.038	11.676	9.216	9.673	10.562	11.334	11.763	11.538
Kingella	14.038	9.510	9.576	9.848	10.541	10.959	12.320	12.149
S. capitis	14.038	9.532	10.004	10.522	10.927	11.656	11.752	11.302

**Tabla N°22**

Datos de concentración de Cromo III obtenidos de la Biosorción por los microorganismos  
aislados

Microorganismo	Días							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Arizona	8.817	7.756	6.144	1.838	0.306	0.155	0.177	0.142
Streptococcus	8.817	5.767	4.879	0.639	0.208	0.186	0.177	0.133
C. aquaticus	8.817	6.286	6.251	1.922	1.207	0.266	0.239	0.177
Klebsiella	8.817	8.741	7.805	3.209	0.439	0.257	0.208	0.146
Consorcio 1	8.817	6.850	6.872	1.047	0.226	0.199	0.226	0.239
Consorcio 2	8.817	5.207	3.871	1.238	0.221	0.901	0.861	0.843
Kingella	8.817	3.276	1.567	1.993	1.247	0.261	0.239	0.257
S. capitis	8.817	4.306	2.131	1.279	0.537	0.275	0.221	0.208

**ANEXO N°2: CÁLCULOS**

Este anexo presenta los diferentes cálculos realizados durante la experimentación.

**Tabla N°23.**

Cálculos para determinar los volúmenes con los cuales se prepararon las soluciones de Cromo Hexavalente de la curva de calibración

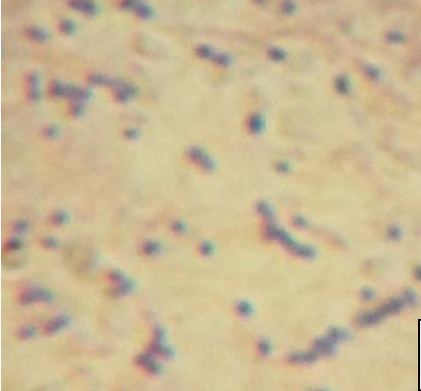
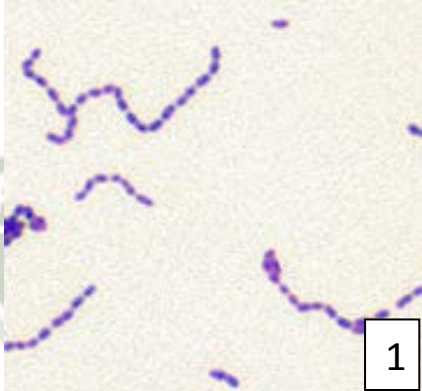
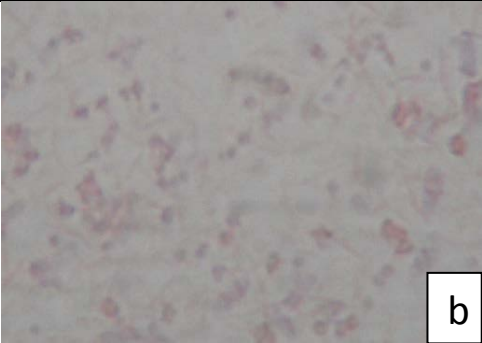
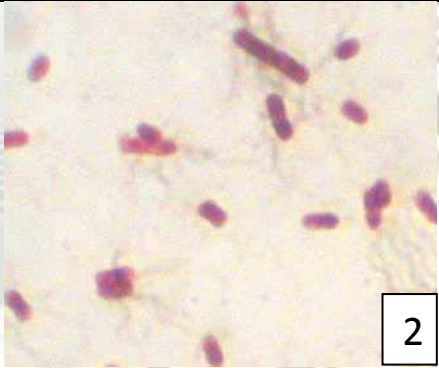

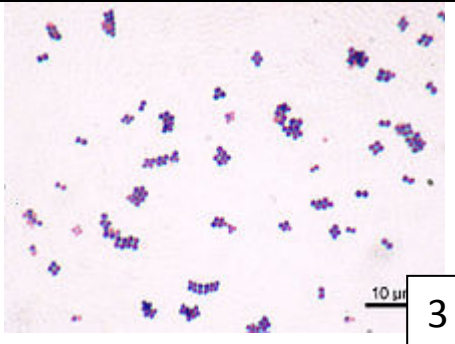
<b>Concentraciones mg/L</b>	<b>Volumen requerido</b>
0.08	$\frac{25ml * 0.08mg/L}{5mg/L} = 0.4ml$
0.2	$\frac{25ml * 0.2mg/L}{5mg/L} = 1ml$
0.4	$\frac{25ml * 0.4mg/L}{5mg/L} = 2ml$
0.6	$\frac{25ml * 0.6mg/L}{5mg/L} = 3ml$
0.8	$\frac{25ml * 0.8mg/L}{5mg/L} = 4ml$
1.0	$\frac{25ml * 1.0mg/L}{5mg/L} = 5ml$


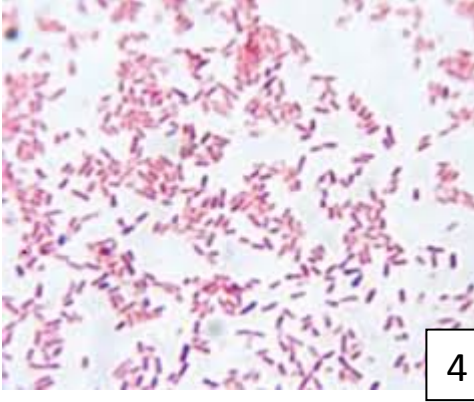
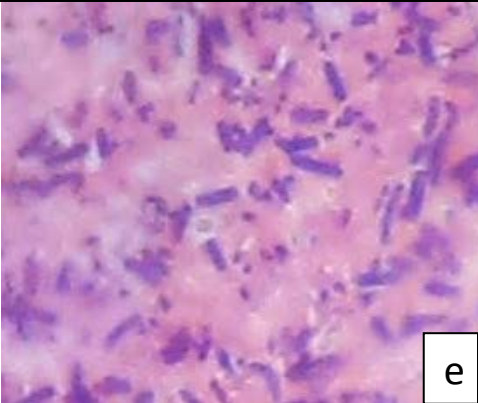



**ANEXO N°3: GALERIA DE FOTOS**

Este anexo presenta una galería de fotos en donde se comparan las imágenes de la morfología celular de las cepas estudiadas tomadas durante la experimentación comparadas con fotografías de distintos autores.

**Tabla N°24.**

Galería de fotos de la morfología de las cepas aisladas.


Cepas aisladas	Autores	Microorganismo
 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">a</div>	 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">1</div>	<p style="text-align: center;"><b>Streptococcus grupo D</b></p>
 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">b</div>	 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">2</div>	<p style="text-align: center;"><b>Kingella</b></p>
 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">c</div>	 <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">3</div>	<p style="text-align: center;"><b>Staphylococcus capitis</b></p>

 <div data-bbox="630 520 686 590" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">d</div>	 <div data-bbox="1154 520 1211 590" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">4</div>	<p><b>Klebsiella</b></p>
 <div data-bbox="646 982 703 1052" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">e</div>	 <div data-bbox="1154 968 1211 1037" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">5</div>	<p><b>Corynebacterium aquaticus</b></p>
 <div data-bbox="646 1373 703 1442" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">f</div>	 <div data-bbox="1154 1373 1211 1442" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">6</div>	<p><b>Arizona</b></p>

**FUENTE:** Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed. edición). McGraw Hill.

## ANEXO N°4: CERTIFICACIÓN

Este anexo presenta los certificados de los distintos laboratorios consultados para las determinaciones de Cromo Total, Cromo Hexavalente, Barrido de metales, utilizado en la virtualización a escala del PIRS.



### Laboratorios Analíticos del Sur

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


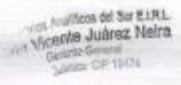
Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582 [www.laboratoriosanaliticosdelsur.com](http://www.laboratoriosanaliticosdelsur.com)

**INFORME DE ENSAYO LAS-13- 01889**

Hoja de resultados 26/04/2013  
Pág.: 3/5

Código Interno	Nombre de Muestra	787 Cu MT mg/L	787 Fe MT mg/L	787 K MT mg/L	787 Li MT mg/L	787 Mg MT mg/L	787 Mn MT mg/L	787 Mo MT mg/L	787 Na MT mg/L	787 Ni MT mg/L	787 P MT mg/L
AG13000223	PMA-1 D2 2B	0,00453	0,1212	70,4	0,1083	11,48	0,02085	0,00497	>125	0,01557	2,147
AG13000224	PMA-2 D2 2C	0,00527	0,0598	65,1	0,0969	11,99	0,01709	0,00388	>125	0,01524	1,990
AG13000225	PMA-4 1 INICIAL	0,02032	0,4119	66,8	0,1035	20,43	0,05687	0,00387	>125	0,01760	3,027

MT=metales totales  
Nota: El resultado: "<Valor Numérico", significa, que se encuentra por debajo del límite de detección indicado.

Victor Juárez Nelra  
Gerente General  
Juliano CP 18474

El resultado: "< Valor numérico", significa, que se encuentra debajo del límite de cuantificación indicado.  
 Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.  
 Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



## Laboratorios Analíticos del Sur

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

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

### INFORME DE ENSAYO LAS-13- 01889

Hoja de resultados

26/04/2013

Pág.: 2/5

Código Interno	Nombre de Muestra	787 Ag MT mg/L	787 Al MT mg/L	787 B MT mg/L	787 Ba MT mg/L	787 Be MT mg/L	787 Ca MT mg/L	787 Cd MT mg/L	787 Co MT mg/L	787 Cr MT mg/L
AG13000223	PMA-1 D2.2B	<0,0005	0,0345	1,553	0,09921	<0,0000062	>125	0,000419	0,00061	0,32366
AG13000224	PMA-2 D2.2C	<0,0005	0,0066	1,455	0,08966	<0,0000062	>125	0,000732	0,00065	0,29859
AG13000225	PMA-4 1 INICIAL	0,01169	0,4173	1,613	0,10826	<0,0000062	>125	0,000539	0,00061	5,3730

.MT=metales totales

Nota: El resultado: "<Valor Numérico", significa, que se encuentra por debajo del límite de detección indicado.

Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.  
Sixto Vicente Juárez Neira  
Gerente General  
Químico CIP 19474

El resultado: "< Valor numérico", significa, que se encuentra debajo del límite de cuantificación indicado.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



## Laboratorios Analíticos del Sur

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

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

### INFORME DE ENSAYO LAS-13- 01889

Hoja de resultados

26/04/2013

Pág.: 4/5

Código Interno #	Nombre de Muestra	787 Pb MT mg/L	787 Sb MT mg/L	787 Se MT mg/L	787 SiO <sub>2</sub> MT mg/L	787 Sn MT mg/L	787 Sr MT mg/L	787 Ti MT mg/L	787 TI MT mg/L	787 V MT mg/L	787 Zn MT mg/L
AG13000223	PMA-1 D2.2B	0,0100	0,0042	0,0020	11,95	0,00786	0,46068	0,00177	<0,0014	0,00296	0,07160
AG13000224	PMA-2 D2.2C	0,0052	0,0025	0,0052	12,83	0,01034	0,41689	0,00112	<0,0014	0,00304	0,07378
AG13000225	PMA-4 1 INICIAL	0,0100	0,0460	0,0046	21,35	0,00166	0,47081	0,01190	<0,0014	<0,00018	0,14434

.MT=metales totales

Nota: El resultado: "<Valor Numérico", significa, que se encuentra por debajo del límite de detección indicado.

  
Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.  
Sixto Vicente Juárez Nelra  
Gerente General  
Sucreo: 054-443294

El resultado: "< Valor numérico", significa, que se encuentra debajo del límite de cuantificación indicado.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.

Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



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

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



**INFORME DE ENSAYO**  
**Nº DE INFORME: ANA24F13.000847B**

<b>Nombre del Cliente</b>	: DIEGO PRADO SALINAS
<b>Dirección del Cliente</b>	: URB. BUENA VISTA D-1 YANAHUARA
<b>RUC</b>	: NO CORRESPONDE
<b>Condición del Muestreado</b>	: POR EL CLIENTE
<b>Descripción</b>	: AGUA RESIDUAL C
<b>Tamaño de muestra</b>	: 500 mL
<b>Fecha de Recepción</b>	: 24/06/2013
<b>Fecha de Inicio del Ensayo</b>	: 24/06/2013
<b>Fecha de Emisión de Informe</b>	: 01/07/2013
<b>Página</b>	: 1 de 1

**I. ANALISIS FISICO - QUIMICO:**

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACION DE CROMO HEXAVALENTE (mg/ L) Métodos Normalizados Para el Análisis de Aguas Potables y Residuales APHA, AWWA, WPCF, 3500 Cr Método D Pag 3-102	1,12

**OBSERVACIONES:**

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

Ricardo A. Abril Ramirez  
CQFDA 00624  
JEFE DE LABORATORIO LECC



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



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

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



**INFORME DE ENSAYO**  
**Nº DE INFORME: ANA24F13.000847A**

<b>Nombre del Cliente</b>	: DIEGO PRADO SALINAS
<b>Dirección del Cliente</b>	: URB. BUENA VISTA D-1 YANAHUARA
<b>RUC</b>	: NO CORRESPONDE
<b>Condición del Muestreado</b>	: POR EL CLIENTE
<b>Descripción</b>	: AGUA RESIDUAL B
<b>Tamaño de muestra</b>	: 500 mL
<b>Fecha de Recepción</b>	: 24/06/2013
<b>Fecha de Inicio del Ensayo</b>	: 24/06/2013
<b>Fecha de Emisión de Informe</b>	: 01/07/2013
<b>Página</b>	: 1 de 1

**I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:**

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACION DE CROMO HEXAVALENTE (mg/ L) Métodos Normalizados Para el Análisis de Aguas Potables y Residuales APHA, AWWA, WPCF, 3500 Cr Método D Pag 3-102	0,72

**OBSERVACIONES:**

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

Q.F. Ricardo A. Abril Ram. r.c.  
CQFDA 00624  
JEFE DE LABORATORIO LECY



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



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



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



**INFORME DE ENSAYO**  
**Nº DE INFORME: ANA24F13.000847C**

<b>Nombre del Cliente</b>	: DIEGO PRADO SALINAS
<b>Dirección del Cliente</b>	: URB. BUENA VISTA D-1 YANAHUARA
<b>RUC</b>	: NO CORRESPONDE
<b>Condición del Muestreado</b>	: POR EL CLIENTE
<b>Descripción</b>	: AGUA RESIDUAL CRUDA
<b>Tamaño de muestra</b>	: 500 mL
<b>Fecha de Recepción</b>	: 24/06/2013
<b>Fecha de Inicio del Ensayo</b>	: 24/06/2013
<b>Fecha de Emisión de Informe</b>	: 01/07/2013
<b>Página</b>	: 1 de 1

**I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:**

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACION DE CROMO HEXAVALENTE (mg/ L) Métodos Normalizados Para el Análisis de Aguas Potables y Residuales APHA, AWWA, WPCF, 3500 Cr Método D Pag 3-102	2,24

**OBSERVACIONES:**

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

R. Ricardo A. Abril Ramirez  
CQFDA 00624  
JEFE DE LABORATORIO LECC



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

**ANEXO N°5:*****ANÁLISIS ESTADÍSTICO***

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el uso del programa IBM SPSS Statistics versión 19 para los datos obtenidos en la determinación de la degradación de cromo III y VI en aguas sintéticas presentado en el punto 4.6 de este capítulo. Primero se realizó la prueba de ANOVA, para determinar si existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos para cada microorganismo. Al determinar el valor de  $P < 0.05$ , concluimos que sí existe diferencia significativa entre los microorganismos, y se realiza un test de Tukey para agruparlos según sus diferencias. Los resultados fueron analizados por día tanto para Cromo VI como para Cromo III durante los 3 primeros días de experimentación, ya que en este periodo fue donde los microorganismos presentaron la mayor remoción de Cromo (Sea como VI o III).

***Cromo VI:******Día 1:***

Como se observa en la tabla N°19 que se detalla líneas abajo, cada uno de los microorganismos ha removido el Cromo VI de la solución madre, la cual tiene una concentración inicial de 14.038 mg/L y cada uno de los microorganismos se ha comportado de una manera diferente en el primer día de experimentación.

Se realizó la prueba de ANOVA para determinar si existen diferencias significativas en cada una de las cepas durante los primeros 3 días de experimentación, cuyos resultados se muestran en la Tabla N°20. Se calcularon también los promedios de la biosorción de Cromo VI y la desviación estándar para cada uno de los microorganismos presentada en la Tabla N°19.

**Tabla N°25**

Biorremediación de Cromo VI mediante los microorganismos aislados durante el Día 1  $\pm$  la desviación estándar de cada una de ellas (n=3)

Microorganismo	Promedio	Desviación estándar
Arizona	8.66	$\pm 0.082$
Streptococcus	9.80	$\pm 0.068$
C. aquaticus	8.97	$\pm 0.130$
Klebsiella	9.61	$\pm 0.049$
Consortio 1	9.57	$\pm 0.082$
Consortio 2	11.67	$\pm 0.049$
Kingella	9.51	$\pm 0.082$
S. capitis	9.53	$\pm 0.113$

Tal como se observa en la Tabla N°20 el valor de significancia  $P < 0.05$  determina que sí existe diferencia significativa entre los datos obtenidos por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey , para agrupar las muestras, según su diferencia, como se muestra en la Tabla N°21

**Tabla N°26**

ANOVA de la Biorremediación de Cromo VI resultantes de la experimentación realizada con los microorganismos aislados durante el Día 1

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.(P)
Inter-grupos	16.783	7	2.398	321.555	.000
Intra-grupos	.119	16	.007		
Total	16.902	23			

A continuación se presenta la tabla HSD de Tukey <sup>a</sup> donde se aprecian las diferencias significativas en los grupos formados :

**Tabla N°27**

HSD de Tukey<sup>a</sup> para las concentraciones de Cromo VI en el Día 1

Microorganismo	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		A	B	C	D	E
1,00(Arizona)	3	8.662000				
3,00( C.aquatic)	3		8.977667			
7,00(Kingella)	3			9.511000		
8,00(S.capitis)	3			9.532667		
5,00(Cons 1)	3			9.576000	9.576000	
4,00(Klebsiella)	3			9.619333	9.619333	
2,00(Strep)	3				9.804333	
6,00(Cons 2)	3					11.676333
Sig.		1.000	1.000	.778	.076	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Como se aprecia, los microorganismos *Kingella*, *S.capitis*, *Consortio 1* y *Klebsiella* pertenecen a un mismo grupo, y los *Consortio 1*, *Klebsiella* y *Streptococcus* a otro; por lo tanto, se determinó que entre los primeros microorganismos nombrados, no existen diferencias significativas; en cambio para el caso de los otros tres microorganismos (*Arizona*, *C. aquaticus*, *Consortio 2*) éstos sí presentan diferencias significativas, con respecto a los anteriores.

Los resultados resumidos pueden observarse en la Tabla N °22, donde las letras al lado de los valores promedio representan grupos distintos.

Tabla N °28

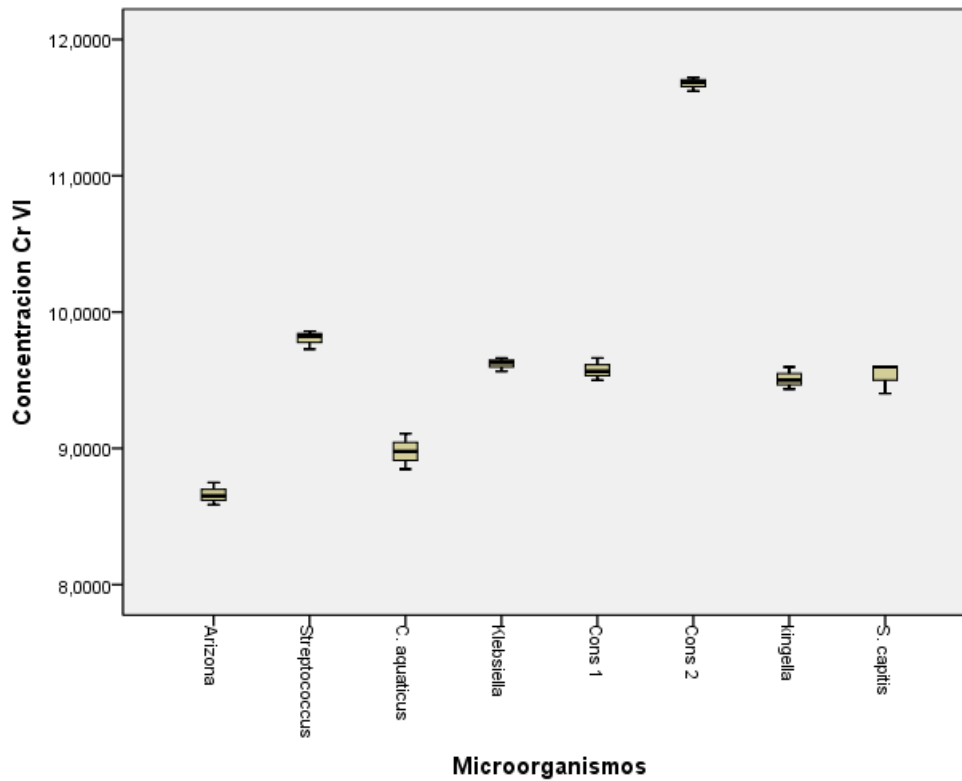
Agrupación de acuerdo HDS Tukey para los microorganismos encargados de la Biorremediación de Cromo VI durante el Día 1

Microorganismo	Promedio
Arizona	8.66 <sup>A</sup>
Streptococcus	9.80 <sup>D</sup>
C. aquaticus	8.97 <sup>B</sup>
Klebsiella	9.61 <sup>C,D</sup>
Consorcio 1	9.57 <sup>C,D</sup>
Consorcio 2	11.67 <sup>E</sup>
Kingella	9.51 <sup>C</sup>
S. capitis	9.53 <sup>C</sup>

\*Las letras a lado de los valores presentados en la tabla indican la división de grupos, según la prueba Tukey ( $p < 0.05$ ).

Como se muestra líneas abajo en la Figura N°14, los resultados obtenidos de la biosorción de Cromo VI de todos los microorganismos estudiados durante el día 1, fueron representados gráficamente mediante un diagrama de caja – bigote (BOX and Whisker ó Box Plot), que muestra la diferencia entre cada uno de éstos y la que existe entre cada una de las repeticiones realizadas para cada microorganismo, en este caso se observa que durante el primer día, el microorganismo Arizona es el que presenta más cantidad de Cromo VI removido, partiendo de una concentración inicial de 14.038 , siguiéndole el microorganismo *Corynebacterium aquaticus*; sin embargo más adelante observaremos que los microorganismos *Streptococcus* y *Corynebacterium aquaticus* son los que tuvieron la mejor performance durante la biorremoción de Cromo VI al finalizar la experimentación .

Como se observa, podemos concluir también que los consorcios no tuvieron una performance ideal.



**FIGURA N°26 .** Diagrama caja- bigote de la Biorremediación de Cromo VI para los microorganismos aislados durante el día 1

Luego, se realizaron los análisis estadísticos correspondientes al día 3 de la experimentación ya que como repetimos en este periodo de tiempo de 3 días, se produjo la mayor remoción de Cromo VI por los microorganismos aislados.

### **Día 3:**

Como se observa en la Tabla N°23 que se muestra más adelante, cada uno de los microorganismos ha removido el Cromo VI de la solución madre, la cual tiene una concentración inicial de 14. 038 mg/L y éstos se han comportado de una manera diferente en el tercer día de experimentación.

Procedimos a realizar la prueba de ANOVA para determinar si existen diferencias significativas en cada una de las cepas durante el tercer día de experimentación ,cuyos resultados se muestran en la Tabla N°24. Se calcularon así mismo los promedios de la biosorción de Cromo VI y la desviación estándar para cada uno de los microorganismos, que se presenta en la Tabla N°23

**Tabla N°29.**

Biorremediación de Cromo VI mediante los microorganismos aislados durante el Día 3  $\pm$  desviación estándar de cada una de ellas (n=3)

Microorganismo	Media	Desviación estándar
Arizona	10.54	$\pm 0.065$
Streptococcus	10.27	$\pm 0.068$
C.aquaticus	8.36	$\pm 0.098$
Klebsiella	9.96	$\pm 0.086$
Consorcio 1	9.25	$\pm 0.115$
Consorcio 2	9.67	$\pm 0.082$
Kingella	9.85	$\pm 0.105$
S. capitis	10.52	$\pm 0.068$

Tal como se observa en la Tabla N°24 el valor de significancia  $P < 0.05$  determina que sí existe diferencia significativa entre los datos obtenidos, por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey, para agrupar las muestras, según su diferencia, como se ve en la Tabla N°25.

**Tabla N°30.**

ANOVA de la Biorremediación Cromo VI realizada por los microorganismos aislados durante el Día 3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig(P)
Inter-grupos	11.181	7	1.597	207.927	.000
Intra-grupos	.123	16	.008		
Total	11.304	23			

A continuación se presenta la tabla HSD de Tukey<sup>a</sup> donde apreciamos las diferencias significativas en los grupos formados:

**Tabla N°31**

HSD de Tukey<sup>a</sup> para las concentraciones de Cromo VI en el Día 3

Microorganismo	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		A	B	C	D	E	F
3,00(C.aquaticus)	3	8.357273					
5,00(Consortio 1)	3		9.249586				
6,00(Consortio 2)	3			9.673979			
7,00( Kingella)	3			9.848089	9.848089		
4,00(Klebsiella)	3				9.956908		
2,00(Streptococcus)	3					10.272482	
8,00(S.capitis)	3						10.522765
1,00(Arizona)	3						10.544529
Sig.		1.000	1.000	.290	.786	1.000	1.000

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Los resultados resumidos pueden observarse en la Tabla N°26, las letras al lado de los valores promedio representan grupos distintos.

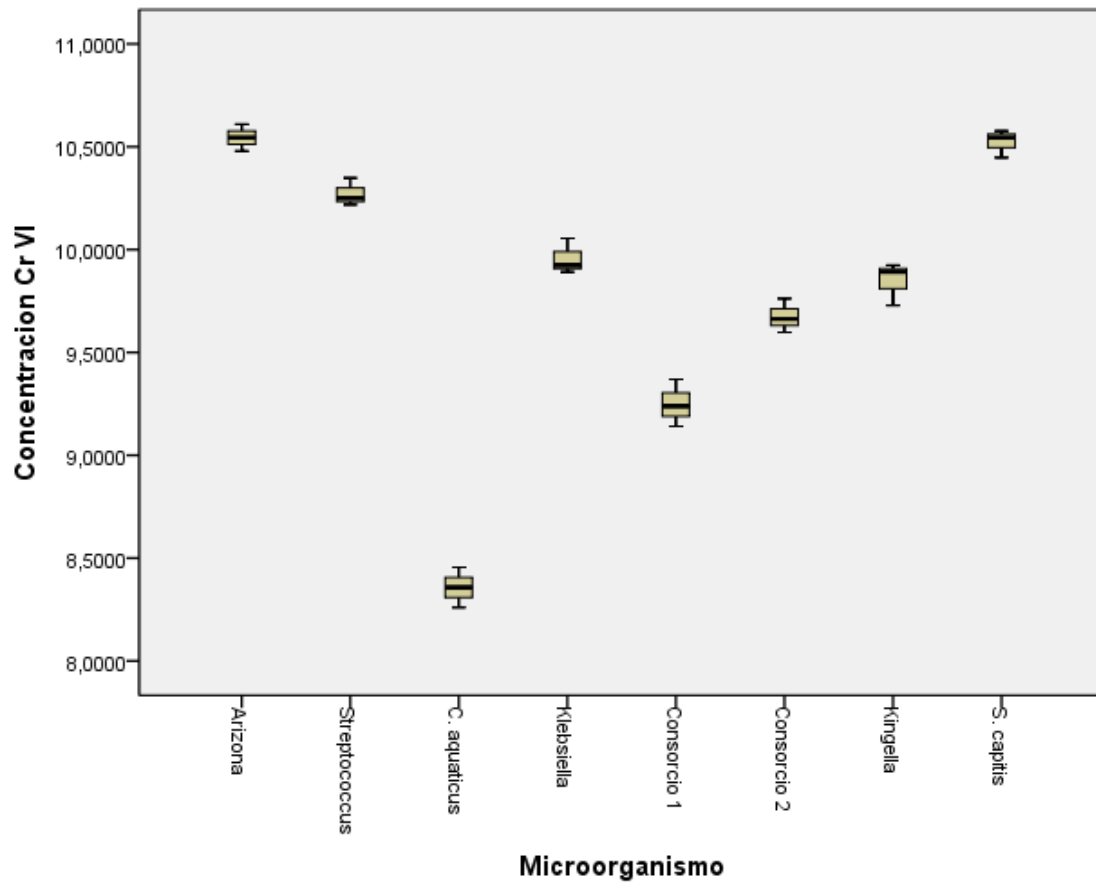
Como se ve, los microorganismos *Kingella* y *Consortio 2* pertenecen a un mismo grupo; *Klebsiella* y *Kingella* a otro y *S.capitis* y *Arizona* a un tercer grupo ; por lo tanto, se determinó que en los microorganismos nombrados, no existen diferencias significativas; en cambio para el caso de los otros dos microorganismos (*C. aquaticus*, *Consortio* ) sí presentan diferencias significativas, con respecto las anteriores .

Tabla N°32.

Agrupación de acuerdo HDS Tukey para los microorganismos encargados de la Biorremediación de Cromo VI durante el Día 3

Microorganismo	Promedio
Arizona	10.54 <sup>F</sup>
Streptococcus	10.27 <sup>E</sup>
C. aquaticus	8.36 <sup>A</sup>
Klebsiella	9.96 <sup>D</sup>
Consorcio 1	9.25 <sup>B</sup>
Consorcio 2	9.67 <sup>C</sup>
Kingella	9.85 <sup>C,D</sup>
S. capitis	10.52 <sup>F</sup>

Como podemos observar en el diagrama de caja –bigote en la Figura N°15, se observa que durante este tercer día el microorganismo *C. aquaticus* es el que presenta más cantidad de Cromo VI removido partiendo de una concentración inicial de 14.038mg/ L. Además también se observa que en comparación con el diagrama caja bigote del día 1, existe mayor dispersión de los datos con respecto al promedio de cada una de las muestras, eso también se evidencia en los datos del día 2 y día 3 donde se presenta una mayor desviación estándar que en la del día 1.



**FIGURA N°27** Diagrama caja- bigote de la Biorremediación de Cromo VI para los microorganismos aislados durante el día 3

### *Cromo III*

#### **Día 1:**

Tal como se realizó un análisis estadístico para el caso del Cromo VI, también se hizo otro con los mismos parámetros para el caso del Cromo III, con el fin de determinar si nuestros microorganismos también realizan una biosorción significativa.

Como se observa en la Tabla N°27 que se muestra más abajo, cada uno de los microorganismos ha removido el Cromo III de la solución madre, la cual tiene una concentración inicial de 8.81 mg/L y cada uno de éstos se ha comportado de una manera diferente en la experimentación.

Para determinar si existen diferencias significativas en cada una de las cepas durante los primeros 3 días de experimentación, se realizó la prueba de ANOVA, cuyos resultados se

muestran en la Tabla N°28 ;calculándose además, los promedios de la biosorción de Cromo VI y la desviación estándar para cada uno de los microorganismos presentada en la Tabla N°27.

**Tabla N°33.**

Biorremediación de Cromo III mediante los microorganismos aislados durante el Día 1 ± desviación estándar de cada una de ellas (n=3)

Microorganismos	Media	Desviación estándar
Arizona	7.76	±0.108
Streptococcus	5.77	±0.083
C. aquaticus	6.29	±0.035
Klebsiella	8.74	±0.046
Consorcio 1	6.85	±0.034
Consorcio 2	5.21	±0.040
Kingella	3.28	±0.040
S. capitis	4.31	±0.020

Tal como se observa en la Tabla N°28, el valor de significancia  $P < 0.05$  determina que sí existe diferencia significativa entre los datos obtenidos, por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey , para agrupar las muestras, según su diferencia, como se muestra en la Tabla N°29.

**Tabla N°34.** ANOVA de la Biorremediación Cromo III realizada por los microorganismos aislados durante el Día 1

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig(P)
Inter-grupos	67.111	7	9.587	2857.165	.000
Intra-grupos	.054	16	.003		
Total	67.165	23			

A continuación se presenta la tabla HSD de Tukey<sup>a</sup> donde se aprecian las diferencias significativas en los grupos formados :

**Tabla N°35** HSD de Tukey<sup>a</sup> para las concentraciones de Cromo III en el Día 1

Microorganismos	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		A	B	C	D	E	F	G	H
7,00(Kingella)	3	3.276567							
8,00(S.capitis)	3		4.306600						
6,00(Consorcio 2)	3			5.207867					
2,00(Streptococcus)	3				5.767300				
3,00(C.aquaticus)	3					6.286767			
5,00(Consorcio1)	3						6.850600		
1,00(Arizona)	3							7.756333	
4,00(Klebsiella)	3								8.741967
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Se observa que todos los microorganismos pertenecen a un grupo distinto, por lo que se determina que entre estos microorganismos sí existe diferencia significativa entre ellos.

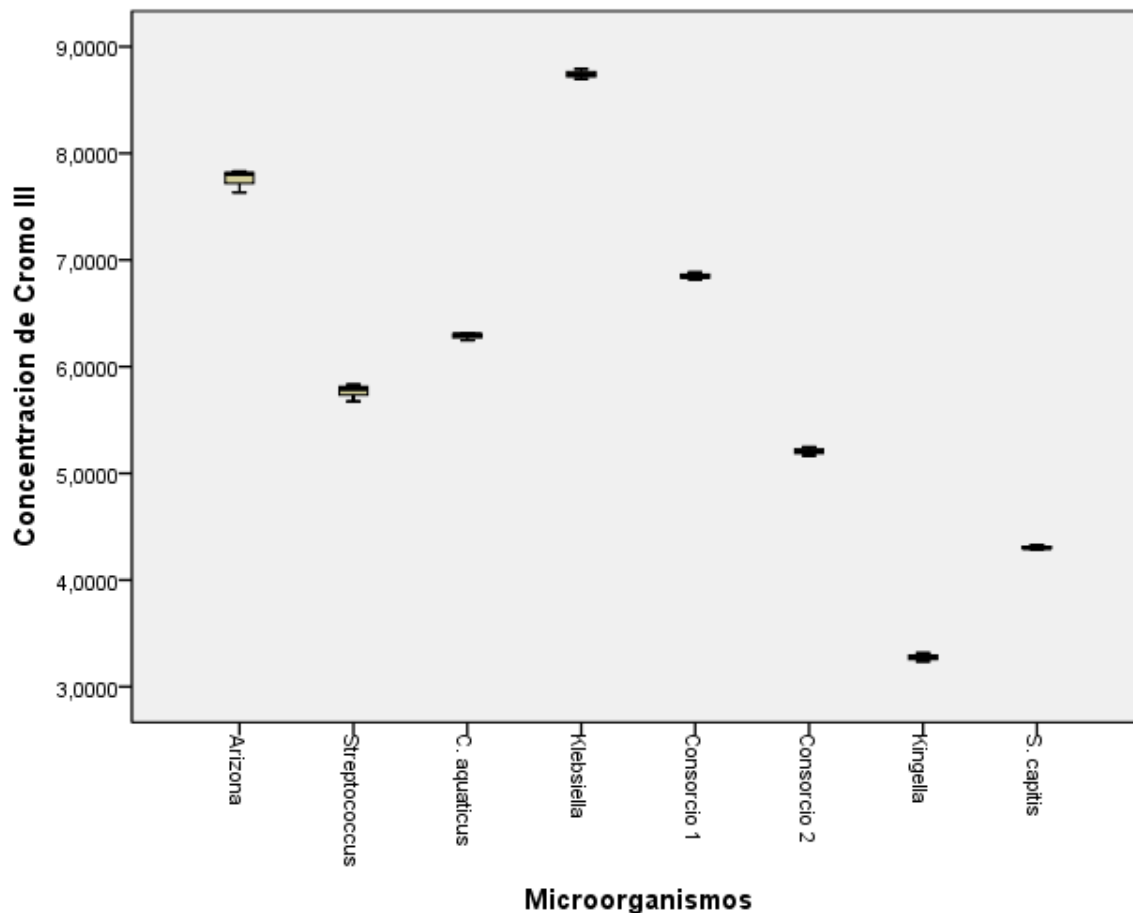
Los resultados resumidos pueden observarse en la Tabla N°30 , donde las letras al lado de los valores promedio representan grupos distintos

**Tabla N°36** Agrupación de acuerdo HDS Tukey para los microorganismos encargados de la Biorremediación de Cromo III durante el Día 1

Microorganismo	Promedio
Arizona	7.76 <sup>G</sup>
Streptococcus	5.77 <sup>D</sup>
C. aquaticus	6.29 <sup>E</sup>
Klebsiella	8.74 <sup>H</sup>
Consorcio 1	6.85 <sup>F</sup>

Consorcio 2	5.21 <sup>C</sup>
Kingella	3.28 <sup>A</sup>
S. capitis	4.31 <sup>B</sup>

Como podemos observar en el diagrama de caja – bigote presentado en la Figura N°16 se observa que durante el primer día el microorganismo *Kingella* es el que presenta más cantidad de Cromo III removido partiendo de una concentración inicial de 8. 81 mg/ L , seguido del *Corynebacterium aquaticus*, Además también se observa que en comparación con el diagrama caja bigote del Cromo VI de los días 2 y 3 , existe mayor dispersión de los datos con respecto al promedio de cada una de las muestras, eso también se evidencia en los datos donde se presenta una mayor desviación estándar que en el caso del Cromo VI.



**FIGURA N°28.** Diagrama caja- bigote de la Biorremediación de Cromo III para los microorganismos aislados durante el día 1

**Día 3:**

Se realizó el análisis estadístico para determinar si existe diferencia significativa entre los datos obtenidos de la biosorción de Cromo III para el tercer día de experimentación.

Se efectuó la prueba de ANOVA para determinar si existen diferencias significativas en cada una de las cepas en este último día de experimentación, cuyos resultados se muestran en la Tabla N°32; también se calcularon los promedios de la biosorción de Cromo VI y la desviación estándar para cada uno de los microorganismos que se presenta en la Tabla N°31.

**Tabla N°37.** Biorremediación de Cromo III mediante los microorganismos aislados durante el Día 3  $\pm$  desviación estándar de cada una de ellas (n=3)

Microorganismo	Media	Desviación estándar
Arizona	1.84	$\pm 0.040$
Streptococcus	0.64	$\pm 0.023$
C. aquaticus	1.92	$\pm 0.034$
Klebsiella	3.21	$\pm 0.058$
Cons 1	1.05	$\pm 0.066$
Cons 2	1.24	$\pm 0.027$
Kingella	1.99	$\pm 0.028$
S. capitis	0.28	$\pm 0.026$

Tal como se observa en la Tabla N°32 el valor de significancia  $P < 0.05$  determina que sí existe diferencia significativa entre los datos obtenidos, por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey, para agrupar las muestras, según su diferencia, como se muestra en la Tabla N°33.

**Tabla N°38.** ANOVA de la Biorremediación Cromo III realizada por los microorganismos aislados durante el Día 3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig(P)
Inter-grupos	17.877	7	2.554	1547.233	.000
Intra-grupos	.026	16	.002		
Total	17.904	23			

A continuación se presenta la tabla HSD de Tukey<sup>a</sup> donde se aprecian las diferencias significativas en los grupos formados :

**Tabla N°39.** HSD de Tukey<sup>a</sup> para las concentraciones de Cromo III en el Día 3

Microorganismo	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		A	B	C	D	E	F	G
8,00( <i>S. capitis</i> )	3	.279667						
2,00( <i>Streptococcus</i> )	3		.639667					
5,00(Consortio 1)	3			1.047667				
6,00(Consortio 2)	3				1.238667			
1,00(Arizona)	3					1.838000		
3,00( <i>C. aquaticus</i> )	3					1.922333	1.922333	
7,00( <i>Kingella</i> )	3						1.993667	
4,00( <i>Klebsiella</i> )	3							3.210000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.246	.427	1.000

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

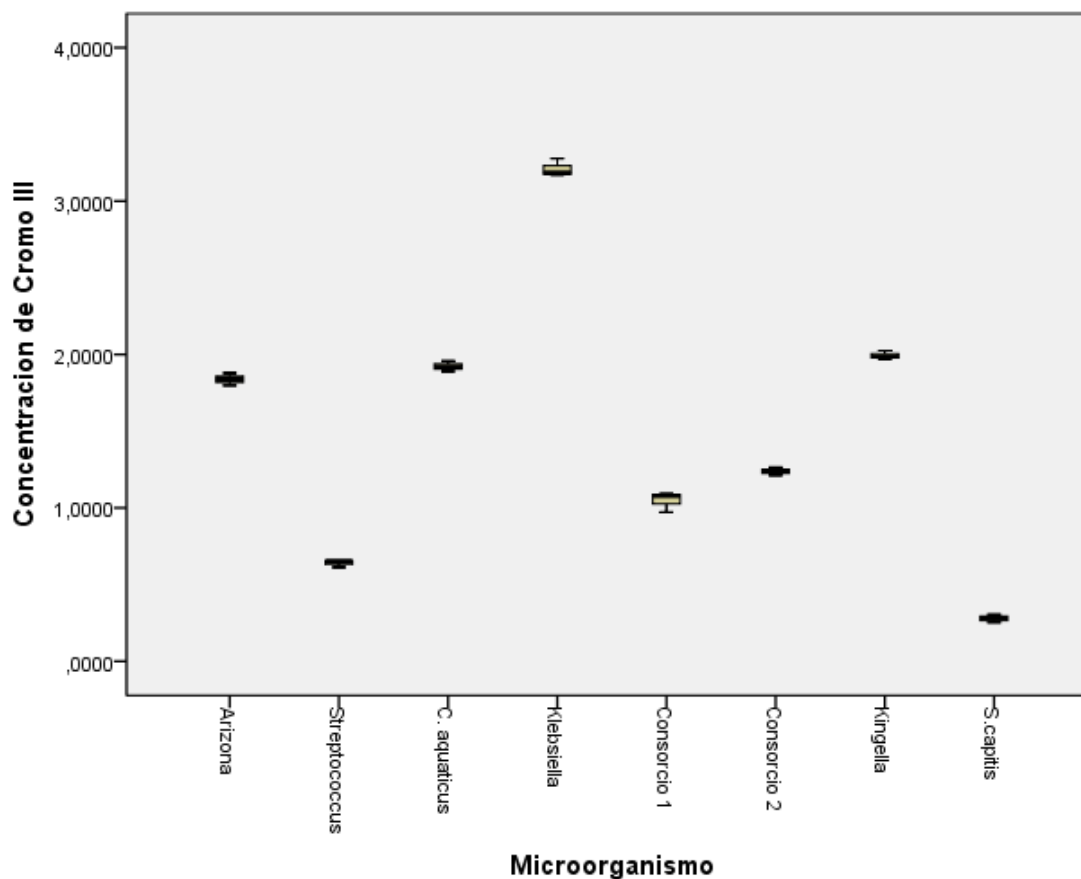
Podemos observar que los microorganismos *Arizona*, *C. aquaticus* y *C. aquaticus* y *Klebsiella* pertenecen a diferentes grupos; por lo tanto, se determina que entre éstos microorganismos no existe diferencia significativa, en cambio para el caso de los otros microorganismos (*S. capitis*, *Streptococcus*, *Consortio1*, *Consortio 2* y *Klebsiella*) sí presentan diferencias significativas.

Los resultados resumidos pueden observarse en la Tabla N°34 , representando las letras al lado de los valores promedio grupos distintos.

**Tabla N°40** Agrupación de acuerdo HDS Tukey para los microorganismos encargados de la Biorremediación de Cromo III durante el Día 3

Microorganismo	Promedio
Arizona	1.84 <sup>E</sup>
Streptococcus	0.64 <sup>B</sup>
C. aquaticus	1.92 <sup>E,F</sup>
Klebsiella	3.21 <sup>G</sup>
Consorcio 1	1.05 <sup>C</sup>
Consorcio 2	1.24 <sup>D</sup>
Kingella	1.99 <sup>F</sup>
S. capitis	0.28 <sup>A</sup>

Al analizar el diagrama de caja – bigote en la Figura N°17 se observa que durante el tercer día los microorganismos *S. capitis* y *Streptococcus* son los que presenta más cantidad de Cromo III removido partiendo de una concentración inicial de 8.81 mg/L , dejando de lado al microorganismos *Kingella* el cual tuvo una buena performance en los dos días anteriores. Además también se observa que en comparación con el diagrama caja bigote de los dos primeros días , aquí se observa mucha dispersión de los datos con respecto al promedio de cada una de las muestras, tal como se evidenció en el caso del Cromo VI.



**FIGURA N°29.** Diagrama caja- bigote de la Biorremediación de Cromo III para los microorganismos aislados durante el día 3

**ANEXO N°6:**

***PROPUESTA PARA UN PLAN DE CONTINGENCIA Y PLAN DE CIERRE PARA LA  
LAGUNA DEL PARQUE INDUSTRIAL RIO SECO.***

***PLAN DE CONTINGENCIA***

***Identificación del Problema:***



Tal como se aprecia en la imagen, la laguna del Parque Industrial de Rio Seco presenta una implementación improvisada, la cual no presenta revestimiento ni de ormgon ni de plástico lo cual es eviente presenta un gran peligro para la población aledaña a la zona. Así como tambien se

puede apreciar que la laguna presenta una vertiente en la cual escurre el agua residual sin tratamiento a las zonas agrícolas y canteras de sillar.

**Objetivos:**

- Evitar la contaminación de los cuerpos de agua provenientes del Parque Industrial Rio Seco.
- Adecuar la laguna de oxidación para evitar derrames a las zonas urbanas aledañas.

**Obras, sistemas y procedimientos:**

- Construcción de sedimentador de lodos
- Construcción de piscina de lodos
- Construcción de trampa de grasas
- Construcción de laguna de sedimentación

Para la laguna de oxidación del Parque industrial de Rio Seco se plantea elaborar una laguna de sedimentación cercana en la cual se puede realizar la recuperación de Cromo. Para la implementación de esta laguna se debe separar el efluente de las grasas características del proceso de curtición.

Para la remoción de partículas y grasas se sugiere un sistema de control y tratamiento conformado por :cárcamos de lavado, trampa de grasas, laguna de retención, piscina de lodos y laguna de sedimentación.

**Cárcamos de lavado:** En los sitios destinados para lavado, se producen aguas con contenido de partículas de diversa naturaleza y aceites. Se debe contar con cárcamos de lavado, para la recolección y posterior tratamiento de las aguas residuales

**Trampa de grasas:** Para remoción de los contaminantes, se propone una trampa de grasas que consta de cuatro compartimientos, en los que se produce remoción las grasas por flotación.

**Laguna de retención:** El efluente procedente de las trampas de grasas se dispone en una laguna de retención. Teniendo en cuenta que partículas más pesadas y de mayor tamaño ya han sedimentado en el primer compartimiento de la trampa de grasas, en la laguna de sedimentación

decantarán las partículas de carbón. Esta laguna se diseña para tratar el volumen de agua efluente de las trampas de grasas, y el volumen del agua generada por precipitaciones, correspondiente al área aferente que drena a la laguna. Adicionalmente se deja una porción del volumen como depósito de lodos de sedimentación.

**Piscina de lodos:** En esta piscina debidamente impermeabilizada, se secarán los lodos aceitosos, para su posterior disposición en rellenos sanitarios o como sustrato para descomposición anaeróbica.

**Sistema recolector de aceites:** Consiste en un cárcamo comunicado mediante una tubería a un tanque de almacenamiento subterráneo, el cual debe tener por lo menos una capacidad de almacenamiento suficiente para el volumen de aceite producidos en un mes. El propósito del sistema es el de evitar el trasiego manual de grasas y aceites, disminuyendo la contaminación. El contenido del tanque será vaciado mediante un sistema de bombeo, transferido a un tanque cisterna y llevado a sitios donde sea reutilizado, reciclado o reprocesado

Una vez finalizada la laguna de sedimentación se propone realizar un posterior tratamiento del agua para que sea utilizada como regadío para las poblaciones cercanas .

### ***PLAN DE CIERRE***

Para el desarrollo del Plan de Cierre y considerando la normatividad actual se requiere de consideraciones tanto técnico-ambientales como sociales. Para el caso de la laguna del Parque Industrial se debe realizar un bombeo de éstas aguas a un lugar seguro donde se le de un tratamiento, así como también un tratamiento a los lodos generados por el vertido de aguas.