

UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

UCSS



TESIS DE INVESTIGACIÓN

**“EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE NITRÓGENO TOTAL Y
FÓSFORO TOTAL PRESENTES EN LAS AGUAS DEL HUMEDAL
DE SANTA ROSA MEDIANTE LA BACTERIA *Pseudomonas putida*
ATCC 49128”**

EJECUTOR:

Bach. JHONY ELMER ANAYA ARCE

ASESORA:

Mg. HEIDI ISABEL SÁNCHEZ TORRES

HUACHO - PERÚ

2019

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA N° 004 - 2019/UCSS/FIA

Siendo las 11:00 am. del día 25 de enero de 2019, en el Auditorio del Local Central de la Sede Lima - Universidad Católica Sedes Sapientiae, el Jurado de Tesis, integrado por:

- | | |
|---|-----------------|
| 1. Ing. Agr. Roger Manuel Mestas Valero | Presidente |
| 2. Blga. Delsy Mariela Trujillo Chávez | Primer Miembro |
| 3. Ing. Quím. Elvira Teófila Castañeda Chirre | Segundo Miembro |
| 4. Blga. Heidi Isabel Sánchez Torres | Asesora |

Se reunieron para la sustentación de la tesis titulada: "EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE NITRÓGENO TOTAL Y FÓSFORO TOTAL PRESENTES EN LAS AGUAS DEL HUMEDAL DE SANTA ROSA MEDIANTE LA BACTERIA *Pseudomonas putida* ATCC 49128", que presenta el bachiller en Ciencias Ambientales, el Sr. **Jhony Elmer Anaya Arce** cumpliendo así con los requerimientos exigidos por el reglamento para la modalidad de titulación, la presentación y sustentación de un trabajo de investigación original, para obtener el Título Profesional de **Ingeniero Ambiental**.

Terminada la sustentación, el Jurado luego de deliberar acuerda:


APROBAR


DESAPROBAR


La tesis, con el calificativo de SUFICIENTE, y eleva la presente Acta al Decanato de la Facultad de Ingeniería Agraria, a fin de que se declare EXPEDITA para conferírle el TÍTULO de INGENIERO AMBIENTAL.

Firmado en Lima, 25 de enero de 2019.


Ing. Agr. Roger Manuel Mestas Valero
PRESIDENTE


Blga. Delsy Mariela Trujillo Chávez
1° MIEMBRO


Ing. Quím. Elvira Teófila Castañeda Chirre
2° MIEMBRO


Blga. Heidi Isabel Sánchez Torres
ASESORA

DEDICATORIA

“Este mensaje va para el cielo”

Este trabajo se lo dedico a mis padres que están en el cielo a don Guillermo y doña Florisa que, a pesar de su ausencia, siempre sentí que están conmigo y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir y disfrutar juntos, sé que este momento hubiera sido muy especial para ellos como lo es para mí. A mis hermanos y hermana Vilma, a quien amo eternamente, por ser el pilar más importante y por demostrarme su apoyo a cada momento, hasta culminar esta linda carrera y etapa de mi vida.

Gracias por estar aquí reunidos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la mujer que hoy forma parte de mi vida Doris, por estar siempre conmigo y ser cómplice de este logro desde mi inicio estudiantil. Quiero dedicar y agradecer a todos mis maestros, por haber estado ayer y hoy conmigo y en especial a mis asesores, Prof. Heidi y Armando, apoyándome en esta etapa de mi sustentación. Así mismo recordar siempre que el éxito es posible con esfuerzo y dedicación.

ÍNDICE GENERAL

CARÁTULA	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE APÉNDICES	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	xiii
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	1
1.1. ANTECEDENTES	1
1.2. BASES TEÓRICAS	5
1.2.1. Humedales	5
1.2.1.1. Contaminación de metales por sustancias químicas	5
1.2.1.2. Degradación y pérdidas de humedales	6
1.2.1.3. Humedales de Santa Rosa-Chancay	6
1.2.2. Bacterias	7
1.2.2.1. El Género <i>Pseudomonas</i>	8
1.2.2.2. Clasificación: Especies más importantes del Género <i>Pseudomonas</i>	9
1.2.2.3. <i>Pseudomonas putida</i>	11
1.2.2.4. Cinética de crecimiento microbiano	12
1.2.3. Eutrofización y nutrientes	13
1.2.3.1. La contaminación de las aguas por compuestos nitrogenados	15
1.2.3.2. Procesos biológicos de nitrificación y desnitrificación vía nitrato	16
1.2.3.3. La contaminación de las aguas por compuestos fosfatados	17
CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS	19
2.1. ÁREA DE ESTUDIO	19
2.2. MATERIALES	20
2.2.1. Material biológico	20

2.3. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO	20
2.3.1. Toma de muestra del agua superficial proveniente del Humedal de Santa Rosa	20
2.3.2. Preparación y caracterización de la muestra provenientes del Humedal	21
2.3.3. Activación de la cepa <i>Pseudomonas putida</i> ATTC 49128	21
2.3.4. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> ATTC 49128	22
2.3.5. Inmovilización del cultivo bacteriano con alginato de calcio	24
2.3.6. Elaboración del biofiltro	25
2.3.7. Tratamientos experimentales	26
2.3.8. Evaluación de la capacidad de remoción de nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT) por la cepa <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 inmovilizado en un sistema de filtro continuo	27
2.3.9. Unidades experimentales	28
2.3.10. Identificación de variables y su medición	28
2.3.11. Diseño de la investigación	30
2.3.12. Análisis de datos	31
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1. RESULTADOS	32
3.1.1. Características fisicoquímicas iniciales de la muestra de agua superficial del Humedal de Santa Rosa	32
3.1.2. Resultados de la cinética de crecimiento de <i>P. putida</i> ATCC49118	33
3.1.3. Variación promedio de la concentración de nitrógeno total	34
3.1.4. Porcentaje de remoción de nitrógeno total	36
3.1.5. Variación promedio de la concentración del fósforo total	38
3.1.6. Porcentaje de remoción de fósforo total.	41
3.1.7. Variación del pH	43
3.1.8. Análisis de la variación de la conductividad.	45
3.1.9. Análisis de la correlación de Pearson	48
3.2. DISCUSIÓN	49
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	55
CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
TERMINOLOGÍA	63
APÉNDICES	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los tratamientos y del control en base de las muestras de agua superficial del humedal Santa Rosa y las esferas inmovilizadas conteniendo a la bacteria <i>P. putida</i> ATCC 49128	27
Tabla 2. Variable en estudio, unidades de medida y método de análisis de los parámetros fisicoquímico de las muestras de agua superficial del humedal Santa Rosa	28
Tabla 3. Valores promedio de los parámetros correspondientes al análisis fisicoquímico de la muestra de agua superficial del humedal de Santa Rosa (Chancay, Lima)	32
Tabla 4. Valores de las concentraciones obtenidas de nitrógeno total (mg/L) con las desviaciones estándares (\pm DS) de los Tratamientos y el control durante 72 h de exposición a las perlas de alginato de calcio con <i>P. putida</i> inmovilizada	35
Tabla 5. Análisis de la varianza de las concentraciones de nitrógeno total en los tratamientos y horas evaluadas	36
Tabla 6. Valores promedios de la remoción (%) de nitrógeno total obtenidos en los cuatros tratamientos y a las distintas horas evaluadas	37
Tabla 7. Análisis de la varianza de la remoción (%) del nitrógeno total en los tratamientos y horas evaluadas	38
Tabla 8. Valores de las concentraciones obtenidas de fósforo total (mg/L) con las desviaciones estándares (\pm DS) en los tratamientos y el control durante 72 h de exposición a las perlas de alginato de calcio con <i>P. putida</i> inmovilizada	39
Tabla 9. Análisis de la varianza de las concentraciones de fósforo total en los tratamientos y horas evaluadas	40
Tabla 10. Valores promedios de los porcentajes de la remoción de fósforo total obtenidos en los cuatro tratamientos a las distintas horas evaluadas	42
Tabla 11. Análisis de la varianza de los porcentajes la remoción del fósforo total en los tratamientos y horas evaluadas	43
Tabla 12. Valores promedios del pH obtenido en los cuatro tratamientos y el control a las distintas horas evaluadas	44
Tabla 13. Valores promedios de la Conductividad (mS/cm) obtenidos en los cuatro tratamientos a las distintas horas evaluadas (promedio \pm D.S)	46
Tabla 14. Coeficientes de correlación lineal de Pearson (<i>r</i>) entre los valores de Nitrógeno total, Fósforo total, Conductividad y pH	48

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Árbol filogenético de los seres vivos deducido de la secuenciación comparativa del gen del RNA ribosómico	8
<i>Figura 2.</i> Árbol filogenético de máxima similitud del género <i>Pseudomonas</i> basado en la secuencia del gen 16S rRNA	10
<i>Figura 3.</i> Morfología de la bacteria <i>Pseudomonas putida</i>	11
<i>Figura 4.</i> Crecimiento de un cultivo microbiano típica en condiciones tipo batch	12
<i>Figura 5.</i> Transformaciones del nitrógeno mediante los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrato	17
<i>Figura 6.</i> Mapa del Humedal Santa Rosa, Chancay-Lima indicando la ubicación de la toma de muestra de agua superficial	19
<i>Figura 7.</i> Toma de muestra de agua superficial de la parte superficial del humedal de Santa Rosa, Chancay-Lima	20
<i>Figura 8.</i> Esterilización del medio de cultivo Agar King B	22
<i>Figura 9.</i> Activación de la cepa, A.-Placa Petri con medio de cultivo Agar King B para la siembra de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128, B.-Placas Petri con la cepa sembrada en la incubadora a 35 °C	22
<i>Figura 10.</i> A. Proceso de la mezcla del alginato con biomasa de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 activas. B. Pesaje de las perlas de alginato de calcio	25
<i>Figura 11.</i> Diseño del biofiltro. (A) Contenedor de acrílico, (B) bomba para agua de 75 Watt, (C) depósito conteniendo la muestra de agua superficial del Humedal de Santa Rosa, (D) manguera de salida, (E) manguera de entrada, (PA) perlas de alginato conteniendo células de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 inmovilizadas, (CE) corriente eléctrica	26
<i>Figura 12.</i> Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128	33
<i>Figura 13.</i> Parámetros cinéticos de crecimiento durante la fase exponencial de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128	34
<i>Figura 14.</i> Resultado de los valores de nitrógeno total (mg/L) en los cuatro tratamientos durante 72 horas evaluadas	35
<i>Figura 15.</i> Resultado de los porcentajes promedio de remoción de nitrógeno total en los cuatro tratamientos durante las 72 horas evaluadas	37
<i>Figura 16.</i> Resultado de los valores de fósforo total (mg/L) en los cuatro tratamientos durante las 72 horas evaluadas	40

<i>Figura 17.</i> Resultado de los valores promedio de los porcentajes de remoción de fósforo total (%) en los cuatro tratamientos durante 72 horas evaluadas	42
<i>Figura 18.</i> Resultado de los valores promedio de pH en los cuatro tratamientos durante 72 horas evaluadas	45
<i>Figura 19.</i> Resultado de los valores promedio de la conductividad (mS/cm) en los cuatro tratamientos durante 72 horas evaluadas	47

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice 1. Registro de la cantidad de colonias (UFC) de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 obtenida en las diferentes horas evaluadas	65
Apéndice 2. Prueba de Tukey de la variación de la concentración de nitrógeno total a las diferentes horas	66
Apéndice 3. Prueba de Tukey de la variación de la concentración de fósforo total a las diferentes horas	67
Apéndice 4. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para agua (Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM): Parámetros físico-químicos para la categoría 4	68
Apéndice 5. Registro fotográfico de la investigación	69
Fotografía 5.1. Lugar de la toma de muestra en el Humedal de Santa Rosa	69
Fotografía 5.2. Preparación de las esferas de alginato.	69
Fotografía 5.3. Observación de <i>Pseudomona putida</i> ATCC 49128 después de su coloración Gram	70

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la remoción de nitrógeno total y fósforo total en las muestras de agua superficial del humedal de Santa Rosa, Chancay-Lima por la bacteria *Pseudomonas putida* ATCC 49128. La bacteria fue activada en Agar King B a 24 h a 35°C en aerobiosis. El experimento consistió en cuatro tratamientos más un control en el que se empleó diferentes pesos de perlas de alginato de calcio conteniendo a *P. putida* ATCC 49128. Se evaluó la capacidad de remoción a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h, a nivel de laboratorio en un biofiltro. Los resultados indicaron que el tratamiento 3 (T3) fue el que mostro los valores más altos de remoción de los dos elementos químicos evaluados, con $88,76 \pm 0,99$ % a las 72 h de exposición para el nitrógeno total y $53,8 \pm 1,6$ % a las 60 h de exposición para el fósforo total. Respecto al pH, cuyo valor inicial fue de $8,2 \pm 0,01$, durante toda la investigación se observó un cambio del valor en todos los tratamientos; siendo su valor mínimo de 7,74 y el máximo de 8,38. En esta investigación la remoción más notable de fósforo total y nitrógeno total se observaron a valores de pH de 8,14 a 8,15 respectivamente. Se demuestra la viabilidad, a nivel de laboratorio, de la remoción de nitrógeno total y fósforo total presentes en el agua superficial del humedal de Santa Rosa por la acción de la bacteria *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizada en un biofiltro de flujo continuo.

Palabras clave: Remoción de nitrógeno total y fósforo total, *Pseudomonas putida* ATCC 49128, inmovilización bacteriana, humedal de Santa Rosa.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the removal of total nitrogen and total phosphorus in the superficial water samples of the Santa Rosa wetland, Chancay-Lima by the bacterium *Pseudomonas putida* ATCC 49128. The bacterium was activated in Agar King B 24 hours at 35 ° C in aerobiosis. The experiment consisted of four treatments plus a control in which different weights of alginate beads containing *P. putida* ATCC 49128 were used. Removal capacity was evaluated at 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours, at the laboratory level in a biofilter. The results indicated that treatment 3 (T3) was the one that showed the highest removal values of the two chemical elements evaluated, with 88.76 ± 0.99 % at 72 hours of exposure for total nitrogen and 53.8 ± 1.6 % at 60 hours of exposure for phosphorus. Regarding the pH, whose initial value was 8.2 ± 0.01 , the value changed in all treatments; the minimum ph value was 7.74 and the maximum value was 8.38. In this investigation, the most notable removal of total phosphorus and total nitrogen were observed at pH values of 8.14 to 8.15 respectively. The feasibility, at laboratory level, of the total nitrogen and total phosphorus removal present in the superficial water samples from the Santa Rosa wetland by the action of the bacterium *Pseudomonas putida* ATCC 49128 immobilized in a continuous flow biofilter was demonstrated.

Key words: Total nitrogen and total phosphorus removal, *Pseudomonas putida* ATCC 49128, bacterial immobilization, Santa Rosa wetland.

INTRODUCCIÓN

Los humedales se encuentran entre los ecosistemas más productivos del planeta y son fuentes de diversidad biológica, pues aportan el agua y la productividad primaria de la que innumerables especies vegetales y animales dependen para su supervivencia. Sin embargo, año con año se degradan de forma acelerada generando una disminución a escala mundial, tanto en extensión como en calidad. Como resultado de ello, disminuyen los servicios ecosistémicos que los humedales proporcionan a la sociedad (Blanco y Carbonell, 2001). Los humedales costeros peruanos también presentan amenazas, tales como, el aumento de la población, la eutrofización, la necesidad de los pobladores de utilizar una mayor extensión de tierra para satisfacer sus requerimientos, la ampliación de la frontera agrícola, la contaminación por desagües domésticos e industriales y el pastoreo de ganado doméstico (Álvarez, 2007).

El humedal de Santa Rosa, localizado en la costa central del Perú, Región Lima, es considerado un ecosistema importante del corredor biológico costero. Actualmente la conservación de este ecosistema está amenazada debido a perturbaciones antrópicas, por depósitos de desperdicios orgánicos, criaderos de porcinos, por la ganadería y por la agricultura (Aponte y Ramírez, 2011). Las aguas residuales constituyen uno de los principales problemas en la actualidad, debido a que la construcción de grandes instalaciones para su tratamiento, su transporte a las grandes plantas de tratamiento, los gastos de operación y mantenimiento son muy altos en la mayoría de los casos.

En los últimos años, en varios países, se están aplicando nuevas alternativas que coadyuven como herramientas para prevenir o restaurar los daños ocasionados por acciones antropogénicas o desastres naturales que dañan nuestro ambiente. Una de ellas es la biofiltración; la tecnología de la biofiltración es un método de purificación económico, simple y muy eficaz, que puede ser aplicado a una gran cantidad de compuestos tóxicos y mal olientes. En esta tecnología, se puede emplear material orgánico o inorgánico como soporte físico y, en ocasiones, como fuente de nutriente para una población de organismos (CVT America Technical Bulletin, 1997, citado por Jiménez y Villegas, 2005).

La inmovilización celular de microorganismos ha sido estudiada durante las últimas décadas como la solución y el mejoramiento de sistemas de tratamiento de aguas, suelos y aires contaminados (Garzón y Barragán, 2008). La inmovilización de bacterias del género *Pseudomonas* ha sido probada satisfactoriamente logrando con ello la reducción y degradación de compuestos contaminantes antrópicos más rápidamente (Chitiva y Dussán, 2003).

El propósito de esta investigación fue evaluar la remoción de nitrógeno total (N total) y fósforo total (P total) presentes en las muestras de agua superficial del humedal de Santa Rosa (Chancay, Lima) mediante la bacteria *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizada en alginato de calcio. La puesta en marcha de esta técnica a escala mayor favorecería la recuperación de este importante ecosistema afectado.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la remoción de nitrógeno total y fósforo total presentes en las aguas del humedal de Santa Rosa mediante la bacteria *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizada en alginato de calcio.

Objetivos Específicos

- Realizar la caracterización físico-química de las aguas procedentes del humedal de Santa Rosa, Chancay - Lima.
- Obtener un inóculo de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en un medio de cultivo estándar.
- Realizar la inmovilización de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 con alginato de calcio.
- Evaluar la capacidad de remoción porcentual y la capacidad de eliminación de nitrógeno total y fósforo total presente en las aguas del humedal de Santa Rosa por la biofiltración de la bacteria *Pseudomonas putida* inmovilizadas en alginato de calcio.
- Determinar el mejor tratamiento para la remoción de nitrógeno total y fósforo total.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

Jiménez y Villegas (2005) efectuaron una investigación basada en la eliminación del estireno mediante el uso de un biofiltro conformado por un cultivo mixto de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. El objetivo de la investigación fue diseñar y construir a escala de un sistema piloto de biofiltración para estireno en concentraciones de 100-400 ppm, hasta 10 veces por encima de lo indicado por los valores límite umbral (TLV de 40 ppm), con el fin de simular una atmósfera laboral de alto riesgo para la salud. El crecimiento y adaptación de la masa bacteriana (*P. aeruginosa* y *E. coli*) fue evaluada a partir de cultivos en agar nutritivo, posteriormente se inocularon sobre el soporte inerte (piedra pómez), que fue depositado al interior del biofiltro y se activó el flujo de gas para facilitar la biodegradación. El proceso de biofiltración se realizó a 22 °C y a una humedad relativa de 90 %, durante 10 días, con cinco mediciones diarias. La remoción promedio de estireno en los primeros días de evaluación fue mayor al 55 %; mientras que, al octavo día, la remoción promedio fue superior al 70 %. La biofiltración con cultivos mixtos de *P. aeruginosa* y *E. coli* representa una opción válida para el tratamiento de contaminantes orgánicos volátiles.

Existen investigaciones relevantes relacionadas con la remoción de materia orgánica y nutrientes en agua sintética usando reactores; por ejemplo, González y Saldarriaga (2008) realizaron una investigación con el propósito de reducir nutrientes, como el nitrógeno y el fósforo, en aguas sintéticas de similares características al agua residual doméstica mediante el uso de un tren de tratamiento biológico compuesto por tres cámaras: anaeróbica, anóxica y aerobia. La investigación se realizó en dos etapas en el que se emplearon reactores de diferentes capacidades con lodos activados. La etapa preliminar duró 60 días y comprendió, además de la aclimatación de los lodos activados,

el uso de la espuma de poliuretano como material de soporte en la etapa aerobia. La segunda etapa duró 280 días, en esta etapa debido a problemas de desgaste mecánico sufrido por la espuma, se procedió a reemplazar el material por una mezcla de soportes Anoxkaldnes, el cual se utilizó durante el resto de la experimentación. Se observó que la estabilización del sistema, lográndose un aumento considerable de la eficiencia promedio de remoción de 92,5 % en materia orgánica, 87,7 % en nitrógeno total y 83,5 % en fósforo total, mientras que el pH se mantuvo en valores superiores a 7,2, garantizando la viabilidad del proceso de nitrificación-desnitrificación. El sistema cumplió con buenas condiciones de mezcla y una buena relación de contacto entre la biomasa en suspensión, la biomasa adherida y los sustratos, lo que se evidencia en los elevados valores de remoción de materia orgánica, nitrógeno total y fósforo total logrados en la presente investigación.

La inmovilización de microorganismos en esferas de alginato de calcio como mecanismo en el tratamiento de aguas residuales ha sido abordado por Hernández (2011), quien evaluó la capacidad de remoción de nutrientes de las esferas de alginato de calcio con un cultivo mixto inmovilizado de una microalga y una bacteria (*Chlorella sorokiniana* y *Azospirillum brasilense*, respectivamente) en el tratamiento de aguas residuales domésticas en Baja California, México. Las muestras de agua residual doméstica provinieron de la planta de tratamiento de aguas residuales del Municipio de la Paz, México. Se diseñaron cinco tratamientos (control: sin esferas ni microorganismos, esferas: esferas sin microorganismos inmovilizados, Cs: esferas con *C. sorokiniana* inmovilizado, Abras: esferas con *A. brasilense* inmovilizado y Cs + Abras: esferas con *C. sorokiniana* y *A. brasilense* co-inmovilizados) para el tratamiento terciario de aguas residuales. Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL por quintuplicado, los que fueron inoculados con 4 g de esferas y 100 mL de la muestra de agua residual doméstica, se incubaron a 27 °C con agitación constante de 120 rpm e iluminación constante mediante lámparas fluorescentes. La co-inmovilización mostró tener efectos positivos en el crecimiento de *C. sorokiniana* y se demostró mediante microscopía de fluorescencia e hibridación fluorescente in situ (FISH) que las células de *C. sorokiniana* y *A. brasilense* fueron exitosamente inmovilizadas al interior de las esferas de alginato de calcio, mientras que otros grupos

de microorganismos provenientes de las aguas residuales permanecieron en la superficie de las esferas. El sistema microalga-bacteria mostró ser eficiente en la remoción de amonio y fosfato en las aguas residuales, con valores de 55-70 % para el amonio y > 50 % para el fosfato, en un rango final de pH de 8.2-8.6. Las esferas de alginato de calcio actuaron como una barrera física entre los microorganismos del medio (agua residual doméstica) y los microorganismos inmovilizados, por lo que el sistema de microalga-bacteria es eficiente para la reducción de amonio y fosfato de agua residual doméstica, aunque se requieren más estudios para mejorar su desempeño.

Zaballa et al. (2016) realizaron una investigación para evaluar la capacidad de la microalga *Chlorella vulgaris* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes* co-inmovilizadas en capsulas de alginato para remover el N y P presentes en aguas residuales solidas urbanas (RSU) en la localidad de Rio Grande-Argentina. Los investigadores utilizaron tres tratamientos: el primero con *Chlorella vulgaris* (CV), el segundo con *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (PAC) y el tercero una combinación de ambos microorganismos (CV+PAC). En los resultados de remoción de los nutrientes N y P, la mayor eficiencia lo presento el tratamiento compuesto por ambos microorganismos (CV+PAC). Los mayores valores de remoción de N y P para los tres tratamientos se alcanzó a las 48 h, el porcentaje de remoción de P fue de 64 a 75 %; y el de N estuvo entre 90 y 94 %. Los autores concluyen que tanto las algas como las bacterias resultaron ser tan eficaces en la remoción de excedentes de N y P y que este método fue efectivo en tiempos cortos y que además permite ahorrar tiempo y dinero en los tratamientos *in situ*.

Actualmente, no existe ningún estudio en Perú referido a la utilización de la cepa bacteriana *Pseudomonas putida* ATCC 49128, inmovilizadas en alginato, para biorremediar ecosistemas acuáticos o aguas residuales. La cepa de *P. putida* solo se ha utilizado para la remoción de metales, pero sin inmovilizarla. Así por ejemplo, Mayta y Vela (2015), realizaron una investigación que tuvo como objetivo la evaluación de la capacidad de remoción de cromo por *P. putida* en un biorreactor Airlift de tubos concéntricos (biorreactor a escala de laboratorio). Para ello los investigadores inocularon *P. putida* (10^4 UFC/mL) en un birreactor y las sometieron a concentraciones

iniciales de cromo (VI) de 7 mg/L y 50 mg/L, se mantuvieron a una temperatura constante de 30 °C y un flujo de aire de 1,0 L/min; el volumen inicial en el reactor fue de 3,7 L. Las determinaciones de las variaciones de cromo fueron hechas con el método colorimétrico de 1,5 – Difenilcarbazida, por medio de un espectrofotómetro. Los resultados mostraron que en el tratamiento de 7 mg/L se tuvo una remoción de cromo (VI) de 96,8 % a los 7 días de operación, la concentración final de este tratamiento fue de 0,22 mg/L. En el tratamiento de 50 mg/L el porcentaje de remoción de cromo (VI) fue de 98,62 % a los 26 días de operación, con una concentración final de 0,68 mg/L. Los autores concluyeron que este método de reducción biológica es eficiente para bajas concentraciones de cromo (VI), logrando llegar a valores de concentración de cromo (VI) menores a 0,5 mg/L, este valor está considerado por debajo de los máximos permisibles de la legislación peruana, siendo la tecnología del birreactor Airlift de tubos concéntricos asociada a las bacterias, muy útil para poder aplicarla como una tecnología limpia y que no es costosa en la biorremediación de aguas.

Cornejo (2015) evaluó la reducción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) de aguas residuales domésticas mediante un sistema de biofiltración a escala laboratorio con levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* adheridas a un soporte inerte de piedra pómez. Para este estudio se construyó un reactor batch de lecho filtrante con piedras pómez, basado en un recipiente plástico abierto con una capacidad total de 6 L, al que se adicionó un cultivo activado de *S. cerevisiae*, bajo condiciones de temperatura ambiente (26-29 °C), y luego se añadió una muestra de 1 L de agua residual doméstica sin coliformes fecales. Se analizó la DBO₅ durante 3 meses cada 5 días/mes, así como pH y sólidos totales (ST). Los resultados mostraron que la eficiencia de remoción promedio para DBO₅ fue 73.79 % (DBO₅ final de 66.46 ppm), mientras que la reducción para el pH fue 32.59 % (pH inicial fue de 8,14 y pH final de 5.5) y ST fue 85.65 % (ST final de 4.7 %). Este sistema de bajo costo permitió obtener altos valores de remoción de DBO₅, pH y sólidos totales.

1.2. BASES TEÓRICAS

1.2.1. Humedales

Tal como define la Convención Ramsar (Ramsar, 2006, p. 2):

Los humedales incluye una amplia variedad de hábitat tales como pantanos, turberas, llanuras de inundación, ríos y lagos, y áreas costeras tales como marismas, manglares y praderas de pastos marinos, pero también arrecifes de coral y otras áreas marinas cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros, así como humedales artificiales tales como estanques de tratamiento de aguas residuales y embalses.

El término “Humedal” o “Wetland” fue inicialmente usado en el año 1956 por la Fish and Wildlife Service (FWS) de los Estados Unidos. La definición se usó en un reporte referido a terrenos bajos con una columna de agua poco profunda o de aguas intermitentes tales como pantanos, ciénagas, turberas y vegas, pozones, fangos y tierras anegadas. También se adicionó en esta definición los lagos poco profundos y pozas con vegetación emergente y de conspicuas características, sin embargo, los cursos de agua permanentes, reservas de agua y lagos profundos no estaban incluidos en esta definición (Ramsar 1971, citado por Zenteno-Rivera, 2010).

1.2.1.1. Contaminación de Humedales por Sustancias Químicas

El término de contaminación de humedales hace referencia a los diferentes grupos o tipos de contaminantes generados por las actividades humana, que son acumulados en el agua, los sedimentos y los organismos, sobre todo aquellos destinados al consumo humano y cuyo contenido de sustancias peligrosas como cadmio, plomo, mercurio, plaguicidas organoclorados entre otros, representa una amenaza ecológica a este tipo de ecosistema (Botello, Ponce & Villanueva, 1999).

1.2.1.2. Degradación y Pérdidas de Humedales

El aumento de la población y el creciente desarrollo de la economía han sido los principales generadores indirectos de degradación y pérdida de ríos, lagos, pantanos de agua dulce y otros humedales continentales (lo que ocasiona la pérdida de especies o disminución de sus poblaciones en estos sistemas). En tanto, los principales generadores directos de degradación y pérdida de ecosistemas incluyen el desarrollo de la infraestructura, la conversión de las tierras, la extracción de agua, la contaminación, la recolección excesiva de plantas usadas como insumos para la artesanía y la sobreexplotación de los recursos hidrobiológicos y la introducción de especies exóticas invasoras.

Los cambios de uso de suelo y el drenaje, frecuentemente para expansión de la agricultura, sumados al aumento en la extracción de agua dulce, son las principales causas de pérdida y degradación de humedales continentales como ciénagas, pantanos, ríos y cuerpos de agua de llanuras de inundación asociadas. Los humedales son muy sensibles a los cambios ambientales, en el componente biótico principalmente, siendo la pérdida de biodiversidad uno de los impactos más fuertes de los humedales (Franco, Delgado y Andrade, 2013).

Actualmente los problemas que afectan a los humedales son: las actividades antrópicas, como la agricultura y el desarrollo urbano, estas resultan ser factores influyentes en el deterioro de humedal. Esta problemática se podría atenuar si se usan metodologías prospectivas para la gestión adecuada en la toma de decisiones, como la tecnología que maneja la información mediante un software, para un buen manejo de los humedales (Senhadji, Ruiz & Rodriguez, 2017).

1.2.1.3. Humedal de Santa Rosa-Chancay

El humedal de Santa Rosa se encuentra localizada al norte de la ciudad de Lima, en el distrito de Chancay, provincia de Huaral; tiene un área aproximada de 32

hectáreas. El humedal se encuentra rodeado por asentamientos humanos y presenta un terreno plano a ligeramente ondulado y sus tierras son usadas para la producción de pastos y cultivos como algodón, camote, fresa y zapallo. Existe aún botaderos de basura y criaderos de cerdos; ciertas zonas del humedal son usados frecuentemente como áreas de pastoreos de ganado ovino y vacuno. Este ecosistema no cuenta con un registro de categorización; sin embargo, en la actualidad se encuentra en un proceso de trámites para ser considerada como Área de Conservación Municipal a cargo de la municipalidad de Chancay.

1.2.2. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada, como los géneros *Chlamydias* y *Rickettsias*. Las bacterias integran el reino Procariota (“pro” de primitivo y “cariota” de núcleo).

Como características principales se puede indicar que los procariotas no poseen compartimientos intracelulares delimitados por membranas, por lo que carecen de membrana nuclear, a diferencia de los eucariotas. El ADN procariota es circular y cerrado, mientras que en los eucariotas el ADN se asocia a proteínas de tipo histonas y se organizan en cromosomas lineales individuales. Poseen una pared celular compuesta por peptidoglicano o mureína (a excepción de los *Mycoplasmas*) o pseudopeptidoglicano mientras que las células eucariotas tienen celulosa o quitina en su pared celular. La reproducción en los eucariotas puede ser tanto sexual como asexual, mientras que los procariotas se reproducen por división simple (forma asexuada). Las células eucariota son de tamaño mayor que las células procariotas, igual que sus ribosomas, ya que en eucariotas es 80 Svedberg (S) (con las subunidades 40S y 60S) y en procariotas es 70S (con las subunidades 30S y 50S). Otra diferencia es la presencia de fimbrias o pilis en las bacterias (Prescott, Harley & Klein, 1999).

En la Figura 1, se observa el árbol filogenético de los seres vivos en donde se muestra al reino Procariota. Según criterios evolutivos, diferenciamos el grupo de las eubacterias y el de las arqueas. Este último comprende a los procariotas con pseudopeptidoglicano en su pared celular, como las anaerobias que viven en condiciones ácidas calientes, las que viven en condiciones salinas y las que reducen el anhídrido carbónico (CO₂) a metano. Por lo tanto, éstas viven en las profundidades del mar, en las aguas saladas y en las fuentes ácidas. Las eubacterias, en cambio, tienen peptidoglicano en su pared celular, viven en el suelo, el agua y en los organismos vivos; entre ellas se encuentran las bacterias de interés médico, las bacterias verdes fotosintetizadores, las cianobacterias o algas verde-azules y las bacterias púrpuras fotosintetizadores (Prescott et al., 1999).

1.2.2.1. El Género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* se caracterizan por ser bacilos rectos, Gram negativos, aerobios, con flagelos polares, son bacterias mesófitas (sobreviven a temperatura de 4 – 42 °C), no generan gas y son indol negativos (Palleroni, 2005). Estos han sido reconocidos durante mucho tiempo por su actividad lipolítica exógena, pero el género todavía contiene muchas especies que no han sido completamente estudiadas. Debido a la maquinaria metabólica versátil y su potencial de adaptación a condiciones ambientales fluctuantes, las especies de *Pseudomonas* son de gran interés para aplicaciones biotecnológicas (Priyanka, Kinsella, Henahan & Ryan, 2018).

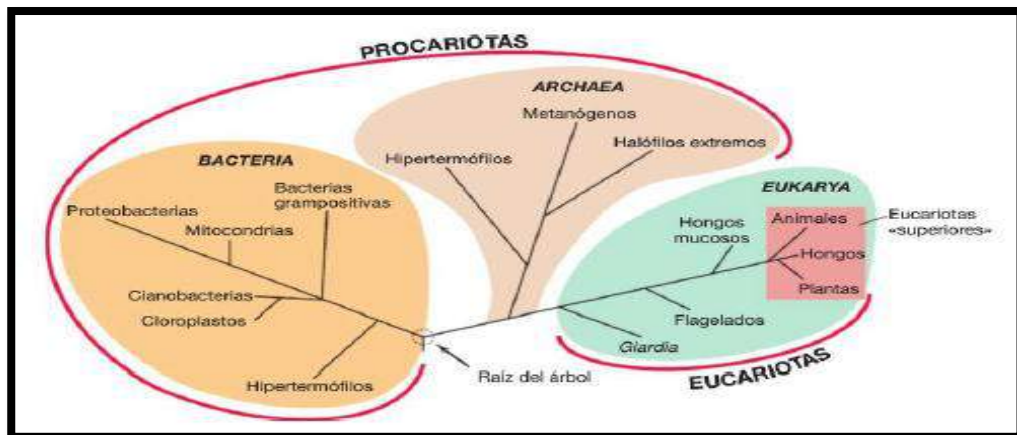


Figura 1. Árbol filogenético de los seres vivos deducido de la secuenciación comparativa del gen del ARN ribosómico. Fuente: Madigan, Martinko, Dunlap & Clark (2009).

Las especies del género *Pseudomonas* metabolizan la glucosa aeróbicamente, algunas especies son quimiolitótrofos y usan H₂ o CO como único donador de electrones; otras pueden usar nitrato como aceptor de electrones anaeróbico; mientras que otros pueden usar arginina como fuente de energía en anaerobiosis. La mayoría de las especies de este género no crecen en condiciones ácidas (pH menor de 4.5) y su hábitat principalmente son ambientes naturales del agua o suelo. Se han establecido diferentes subgrupos dentro de este género, que se explican en la figura 1 más abajo, basado en las características fenotípicas o patogénicas (Madigan et al., 2009).

a. Ecología del género *Pseudomonas*

Las especies del género *Pseudomonas* en la naturaleza son generalmente saprófitas, encontrándolas principalmente en agua y suelo, pudiendo realizarse aislamiento de manera muy sencilla con los medios de cultivo habituales, teniendo como agar de soporte. Existen especies patógenas que pueden afectar a plantas, animales y humanos. La bacteria *P. aeruginosa* es ubicua, por lo que se le puede encontrar en suelo, agua, alimentos, y en la superficie de las plantas y animales.

Algunas especies de este género liberan exopolisacáridos que facilitan la fijación celular en superficies generando la formación de biopelículas. Existen especies capaces de deteriorar la leche no pausterizada (Madigan y Martinko, 2005).

1.2.2.2. Clasificación: Especies más Importantes del Género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* pertenece a la clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales y familia Pseudomonadaceae. Este género presenta una gran diversidad de especies, tal como se observa en la Figura 2. Los primeros investigadores que realizaron la clasificación taxonómica del género *Pseudomonas* fueron Palleroni y colaboradores de la Universidad de California (EE.UU.) (Palleroni, 2005), quienes en 1963 caracterizaron cinco grupos de *Pseudomonas* basados en la hibridización ARNr-ADN. Estudios posteriores,

1.2.2.3. *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida es una bacteria oportunista, cosmopolita, metabólicamente versátil y dinámica, eso lo hace una buena candidata para las aplicaciones biotecnológicas, tales como la biocatálisis, biorremediación y biocontrol. Por ejemplo, se ha observado que esta bacteria tiene la capacidad de colonizar las rizosfera de las plantas y posee una gran capacidad metabólica que facilita el desarrollo de promotores decrecimiento. También se ha realizado estudios en *Pseudomonas putida* para evaluar la degradación de los alcanos (Daane, Harjono, Zylstra y Haggblom, 2001).

La especie *Pseudomonas putida*, que presenta una forma bacilar tal como se aprecia en la Figura 3, también presenta una elevada capacidad de adaptarse a una enorme variedad de condiciones físico-químicas presentes en los distintos hábitats debido a que integra las señales recibidas del medio extracelular con su estado fisiológico, activando una compleja red de regulación del metabolismo celular (Revelles, Espinoza, Fuhrer, Sauer & Ramos, 2005).

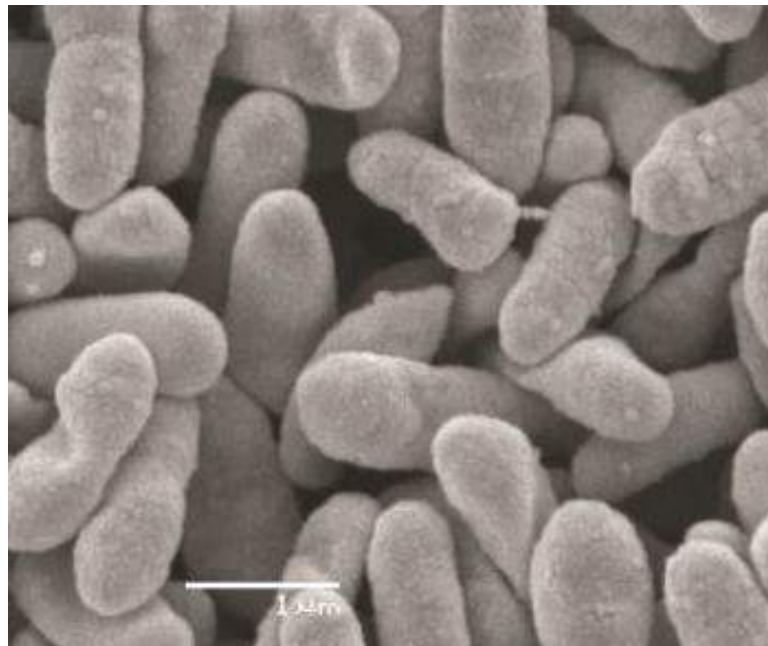


Figura 3. Morfología de la bacteria *Pseudomonas putida*.

Fuente: Obeso, 2017.

1.2.2.4. Cinética de crecimiento microbiano

En microbiología, el término crecimiento se refiere al aumento o crecimiento del número de las células microbianas de una población (Madigan et al., 2009). La cinética de crecimiento microbiano (en cultivos *batch* o en lotes) muestra cuatro fases características: fase lag, fase log o exponencial, fase de desaceleración y fase estacionaria (Figura 4) (Stanbury et al., 2017).

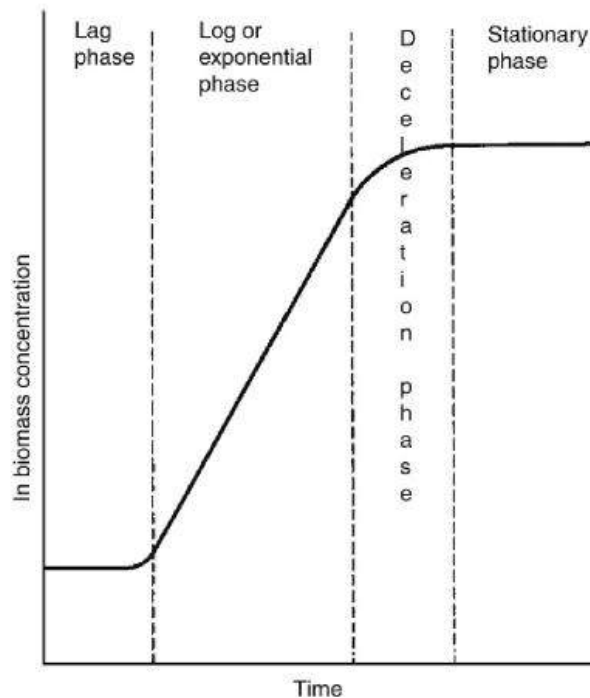


Figura 4. Crecimiento de un cultivo microbiano típico en condiciones tipo batch.

Fuente: Stanbury et al., 2017.

- Fase lag (o latencia): Es el período durante el cual parece que no se observa crecimiento después de la inoculación y se considera como un tiempo de adaptación que experimenta la población microbiana. La duración de la fase lag debe reducirse tanto como sea posible para fines comerciales y esto puede lograrse mediante el uso de un inóculo adecuado (Stanbury et al., 2017).
- Fase log (o exponencial): Es el período en que las células se dividen a una velocidad máxima constante y el incremento en la concentración de

biomasa será proporcional a la concentración inicial de biomasa (Stanbury et al., 2017).

Esta relación proporcional puede transformarse en una ecuación introduciendo una constante, la tasa de crecimiento específica (μ), lo que significa la biomasa producida por hora ($dx/dt = \mu x$) (Stanbury et al., 2017).

La ecuación anterior puede integrarse ($x_t = x_0 e^{\mu t}$) (donde: x_0 es la concentración de biomasa original, x_t es la concentración de biomasa después del intervalo de tiempo, t horas, e es la base del logaritmo natural) y puede aplicarse logaritmos naturales para lograr una ecuación lineal ($\ln x_t = \ln x_0 + \mu t$).

Durante la fase exponencial, los nutrientes se encuentran en exceso y el organismo está creciendo a su tasa de crecimiento específica máxima, μ_{\max} , cuyo valor se verá afectado por la composición del medio, el pH y la temperatura.

- Fase de desaceleración: Es un período en que la tasa de crecimiento del cultivo disminuye hasta que cesa el crecimiento debido al consumo de nutrientes y la excreción de productos microbianos (Stanbury et al., 2017). El consumo del sustrato se ve perjudicado por la acumulación de toxinas o la disponibilidad de otro sustrato (Stanbury et al., 2017).
- Fase estacionaria: Es el cese del crecimiento debido al agotamiento de algunos nutrientes esenciales en el medio (limitación del sustrato), la acumulación de algún producto autotóxico del organismo en el medio (limitación de la toxina) o una combinación de ambos (Stanbury et al., 2017).

1.2.3. Eutrofización y Nutrientes

Roldán y Ramírez (2008, p. 139), indican que eutrofización:

Es un proceso que resulta del aumento de nutrientes, principalmente nitratos y fosfatos, que proporcionan un desarrollo exagerado de fitoplancton y plantas acuáticas. La eutrofización natural ocurre normalmente en cualquier sistema acuático continental o de aguas

costeras. Pero este proceso se ve acelerado por las actividades agrícolas y vertimientos industriales y domésticos en los ecosistemas acuáticos. Este proceso ocasiona; a, aumento de la producción en términos de biomasa; b, disminución de diversidad de especies; c, fuertes fluctuaciones de oxígeno disuelto, dióxido de carbono y pH en el ciclo día-noche; d, alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en el fondo; y e, aparición de densas masas de algas y vegetación acuática que impiden el paso de la luz, aumentan la materia orgánica en descomposición y llevan al lago o embalse a una "distrofia" o desaparición del mismo.

La actividad humana ha alterado profundamente el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (N). Los humanos duplicaron la tasa de entrada de N en el ciclo terrestre de N, y estas tasas siguen aumentando. En general, los insumos antropogénicos actualmente agregan al menos tanto N a los ecosistemas terrestres como lo hacen todas las fuentes naturales combinadas, y los humanos movilizan más de 50 millones de toneladas métricas de N a través de transformaciones terrestres. La producción global de fertilizantes agrícolas aumentó de 10 millones toneladas métricas de N en 1950 a más de 80 millones de toneladas métricas de N en 1990, y su producción está prevista por algunos autores a superar 135 millones de toneladas métricas de N para el 2030 (Vitousek et al., 1997).

Smith, Tilman & Nekola (1999) mencionan que el N es el elemento clave que determina la productividad, la diversidad, dinámica y composición de especies de los ecosistemas terrestres y acuáticos. La tasa de suministro de N y fósforo (P) también influye fuertemente en el crecimiento de algas y plantas vasculares en los ecosistemas dulceacuícolas y marinos.

Los insumos antropogénicos de N son de gran preocupación porque la limitación de nutrientes en la producción de algas se ha demostrado o inferido en muchos ecosistemas estuarinos y marinos. Los efectos de amplio alcance de este

enriquecimiento de nutrientes son fácilmente visibles en los ecosistemas costeros y la degradación en la calidad del agua que acompaña a la eutrofización marina puede tener impactos socioeconómicos significativos (Smith et al., 1999).

La sociedad educada actualmente reconocen que los ecosistemas acuáticos realizan funciones biológicas valiosas, tal como: reciclado de nutrientes, equilibrio en el régimen de descargas de ríos, mantenimiento de napas subterráneas, provisión de hábitats para organismos vivos, purificación del agua y ser un aporte importante para la recreación del hombre. A nivel de la ciencia y tecnología, los nutrientes fosforo y nitrógeno generan su eutrofización, lo que a su vez genera que no se brinden los servicios que la sociedad necesita. En países desarrollados, los generadores de esta eutrofización han sido controlados en su mayoría, debido a lo que se dispone de conocimiento e inversiones necesarias (Carpenter et al., 1998).

1.2.3.1. La contaminación de las aguas por compuestos nitrogenados

En los ecosistemas acuáticos el nitrógeno se presenta en formas inorgánicas como amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). Estos compuestos nitrogenados se han visto incrementado por una serie de actividades antropogénicas. El uso de los fertilizantes nitrogenados en los campos de cultivo se forma como una de las fuentes con más relevancia por el aporte del nitrógeno inorgánico a las corrientes de agua superficial y subterránea, donde el fenómeno de escorrentía se transforma en la principal causa de su desplazamiento sobre el suelo. Con un estimado del 60 % del nitrógeno en las aguas residuales de las zonas urbanas se hallan en forma orgánica, entre los cuales están los aminoácidos, proteínas y urea; y por otra parte la forma inorgánica se encuentra en el 40 % restante, entre ellos se tiene el amonio (Claros, 2012).

Los humedales naturales dulceacuícolas han sido monitoreados para evaluar la capacidad de eliminación de nitrógeno. La carga de N a los humedales refleja características como el tipo y uso del suelo, el exceso de precipitación, las

condiciones de drenaje, el patrón de flujo de aguas subterráneas, entre otros (Kronvang, Jensen, Hoffmann & Boers, 2008).

En Dinamarca, los estudios de humedales naturales dulceacuícolas que reciben recarga de agua subterránea (es decir, humedales mineralotróficos) revelaron que la remoción de N varía de 57 kg N a 2,100 kg N/ha/año, mientras que el porcentaje de remoción relativa de N varía del 56 % al 97 % (Kronvang et al., 2008).

1.2.3.2. Procesos biológicos de nitrificación y desnitrificación vía nitrato

Los procesos de nitrificación son explicados por Claros (2012), a través de la Figura 5, donde se muestra las transformaciones del nitrógeno en las aguas residuales. Este proceso tiene lugar en dos etapas en las que el nitrógeno amoniacal que al ser oxidado cambia a nitrito y consecuentemente a nitrato, y luego por el proceso de desnitrificación, donde el nitrato es reducido a compuestos nitrogenados gaseosos.

En forma amoniacal hay otros procesos de transformación del nitrógeno como el proceso de asimilación, hidrolisis, crecimiento y lisis bacteriana. (Claros, 2012).

El proceso de nitrificación se realiza principalmente por bacterias quimiolitotóxicas que usan el carbono inorgánico para captar carbono para la síntesis celular, y el nitrógeno inorgánico para obtener energía (Claros, 2012).

La desnitrificación consiste en el proceso de reducción del nitrato a nitrito, para posteriormente llegar a compuestos de nitrógeno gaseoso como el óxido nítrico,

óxido nitroso y el nitrógeno diatómico, y todos estos cambios se dan en presencia de una fuente de carbono orgánica (Claros, 2012).

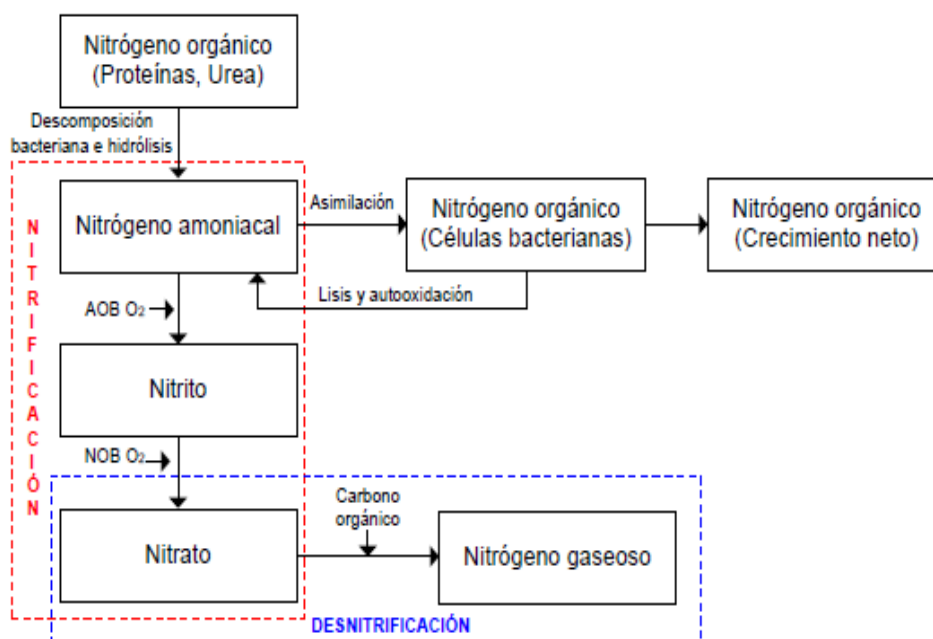


Figura 5. Transformaciones del nitrógeno mediante los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrato.

Fuente: Metcalf y Eddy (1995), citados por Claros (2012).

1.2.3.3. La contaminación de las aguas por compuestos fosfatados

Debido a que los humedales costeros dulceacuícolas se ubican en la parte superior de los estuarios, donde el fósforo (P) se concentra en las cuencas hidrográficas, estos sistemas intermareales pueden ser sitios clave para el secuestro y la transformación de P (Megonigal y Neubauer, 2019).

La fosfatasa es una enzima que libera P, que se encuentra unido a compuestos orgánicos, y es secretada por las plantas, algas y bacterias en condiciones de limitación de PO_4^{3-} . La actividad de la fosfatasa es mayor cuando la demanda biológica de P inorgánico es alta, ya que la mayoría del P en el suelo está en

formas orgánicas y la absorción del suelo limita las concentraciones de PO_4^{3-} en el agua (Megonigal y Neubauer, 2019).

Las interacciones entre la disponibilidad y demanda de P pueden llevar a una retroalimentación positiva que promueva la sucesión del ecosistema, por lo que la alta demanda de P inorgánico reduce las concentraciones disponibles de PO_4^{3-} , lo que incrementa la actividad de la fosfatasa y conduce a una mayor mineralización de P orgánico, lo que aumenta aún más el crecimiento de las plantas (Megonigal y Neubauer, 2019).

A pesar de la alta actividad enzimática de la fosfatasa en los humedales costeros dulceacuícolas, las concentraciones de PO_4^{3-} disuelto son normalmente bajas debido a los efectos combinados de la demanda biológica y los procesos químicos de absorción que eliminan el ion PO_4^{3-} libre de las marismas del pantano (Megonigal y Neubauer, 2019).

En consecuencia, los humedales costeros dulceacuícolas pueden ser sumideros a largo plazo para cantidades significativas de P derivado de una cuenca, pero la extensión de los humedales dentro del estuario (en relación con el tamaño del estuario o cuenca) es importante para determinar su eficiencia (Megonigal y Neubauer, 2019).

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras para la presente investigación fueron colectadas en dos puntos del humedal de Santa Rosa, en las zonas consideradas por el Gobierno Regional de Lima como las de mayor impacto antropogénico, producto de la agricultura, ganadería, y desperdicios orgánicos. Estas se localizaron en las Estaciones 01 y 02, cuyas coordenadas UTM son: 252317.29, 8717492 para la Estación 01 y 252511.70, 8717278.70 para la Estación 02, tal como se observa en la Figura 6.

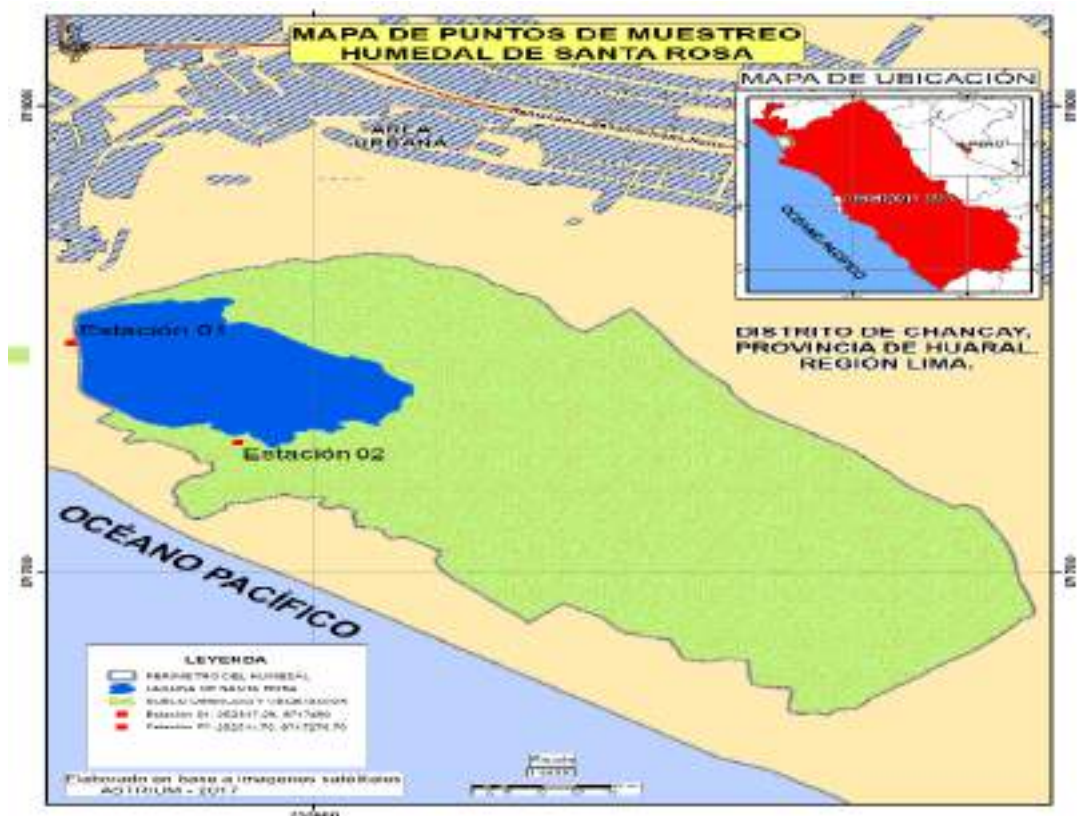


Figura 6. Mapa del Humedal Santa Rosa, Chancay-Lima indicando la ubicación de la toma de muestra de agua superficial.

Fuente: Elaboración propia.

2.2. MATERIALES

2.2.1. Material Biológico

Se empleó una cepa certificada de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 proveniente del banco de cepas de la American Type Culture Collection.

2.3. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

2.3.1. Toma de Muestra del Agua Superficial Proveniente del humedal Santa Rosa

Las muestras de agua superficial para la presente investigación fueron tomadas del humedal de Santa Rosa, ubicado en el distrito de Chancay, provincia de Huaral, región Lima, el 10 de octubre del año 2017. Durante la toma de muestra se tuvo en cuenta las características que presentaron el entorno al cuerpo de agua superficial presente en el lugar (Figura 7), la toma de muestra fue realizada en la zona del litoral del humedal de Santa Rosa. Posteriormente se acondicionaron galoneras de plástico de primer uso para el traslado de muestras de agua superficial del humedal, las galoneras no contenían preservantes. A continuación, se procedió al etiquetado de las galoneras y se almacenó en cajas térmica a 4°C aproximadamente, para finalmente, ser analizados en laboratorio. El volumen total colectado fue de 5,0 L.



Figura 7. Toma de muestra de agua de la parte superficial del humedal de Santa Rosa, Chancay-Lima.

2.3.2. Preparación y Caracterización de la Muestra Proveniente del Humedal

Las muestras colectadas del humedal de Santa Rosa fueron trasladadas al Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la UCSS. Posteriormente fueron filtrados 2 veces con papel filtro (Rundfilter 125 mm) para asegurar la completa remoción de partículas en suspensión y se realizó la caracterización físico-química analizando los siguientes parámetros: pH, conductividad, nitrógeno total y fósforo total y luego fueron guardados a 4 °C hasta su posterior uso.

2.3.3. Activación de la Cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128

Para la activación de la cepa, se empleó el medio de cultivo Agar King B, medio selectivo para el crecimiento de bacterias del género *Pseudomonas*. Se preparó el medio Agar King B en condiciones asépticas de esterilización en una autoclave a 15 psi de presión, 121 °C por 15 minutos (Figura 8). Se vertió el medio en placas Petri, se dejó enfriar y se sembró la cepa con la ayuda de un asa de siembra y se incubó durante 24 h a 35 °C, en aerobiosis (Figura 9).

Para el análisis del crecimiento poblacional de las bacterias, se incubaron inóculos de las cepas activadas en tubos con caldo tripticasa de soya a 35 °C, durante 24 h, también en aerobiosis. Además, se realizaron observaciones al microscopio previa tinción de Gram de las colonias que crecieron en las placas con el medio de cultivo (Aquiahuatl, 2012).



Figura 8. Esterilización del medio de cultivo Agar King B.

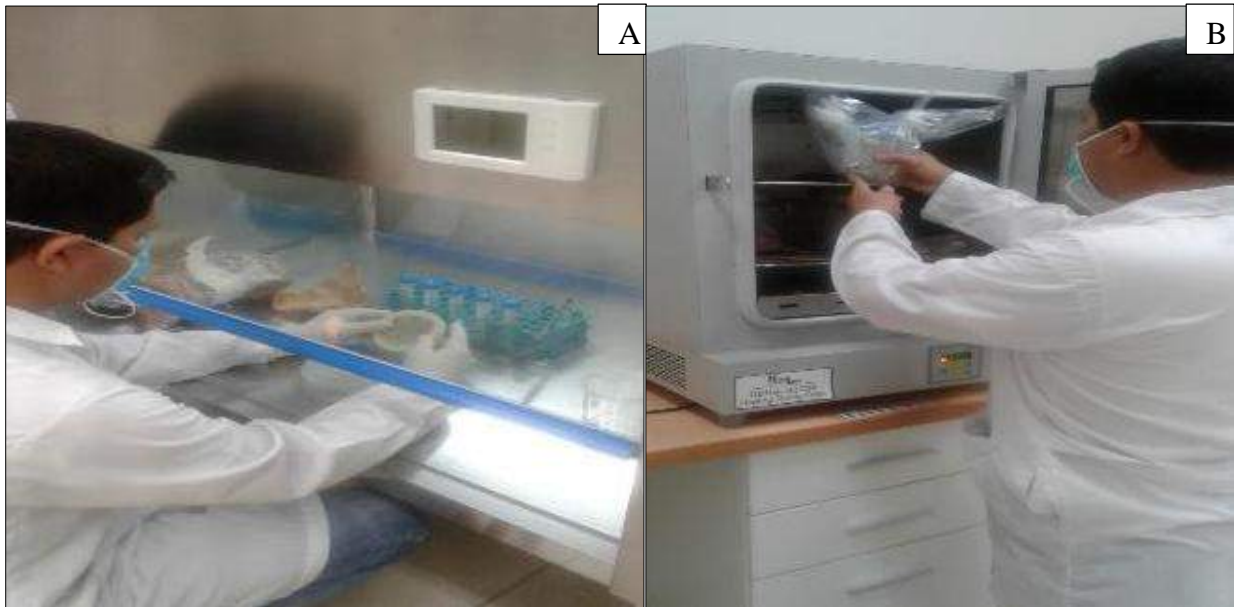


Figura 9. Activación de la cepa, A. Placa Petri con medio de cultivo Agar King B para la siembra de *Pseudomonas putida* ATCC 49128, B. Placas Petri con la cepa sembrada en la incubadora a 35 °C.

2.3.4. Cinética de Crecimiento de *Pseudomonas putida* ATCC 49128

El crecimiento poblacional de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 se estimó mediante el conteo de colonias propuesta por Aquiahuatl y Pérez (2004). Para las diluciones seriadas, se tomó 1,0 mL de cultivo líquido de *P. putida* ATCC 49128 en condiciones asépticas, se depositó en un tubo de ensayo con 9,0 ml de agua

peptonada, la cual correspondió a la dilución 10^{-1} , y luego se hicieron diluciones decimales sucesivas del cultivo hasta alcanzar la dilución 10^{-7} .

Para el conteo de colonias, se depositó 1,0 mL de cada una de las diluciones desde 10^{-3} a 10^{-7} y se distribuyó cuidadosamente el inóculo sobre toda la superficie de la placa de Petri (con Agar King B) con la ayuda de una espátula Drigalsky estéril. Posteriormente, se incubó entre 33-35 °C, durante 24 h y se realizó el conteo directo de colonias en las placas Petri, expresado en UFC (Unidades Formadoras de Colonia) por mL o UFC/mL.

Para elaborar la curva de crecimiento, se sembraron inóculos de la cepa de *P. putida* en el caldo tripticasa de soya en un matraz Erlenmeyer de 50 mL a las mismas condiciones experimentales previamente descritas, se extrajeron muestras de 1 mL, cada hora, durante 24 h. Se realizaron las diluciones (10^{-1} hasta 10^{-4}) se sembraron en placas Petri con Agar King B por triplicado y se realizó el conteo directo de colonias en las placas Petri (en UFC/mL), tal como se mencionó en el párrafo anterior.

Se elaboró una curva de crecimiento bacteriano a partir de los datos anteriores y se determinaron los siguientes parámetros cinéticos: tasa de crecimiento en la fase exponencial (r), expresado como número de colonias por mL en la fase de crecimiento exponencial y tiempo de duplicación (T_2), tiempo en el que una célula bacteriana se duplica (Sánchez, 2014).

Para la tasa de crecimiento se asumió que la dinámica de cultivo se expresó por la Ecuación 1:

$$\ln N_t = a + bt \quad (1)$$

Donde a y b son constantes de la ecuación de la recta, equivalente a la Ecuación 2:

$$N_t = N_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

Donde: N_t : población final, N_0 : población inicial, μ : tasa de crecimiento exponencial, t: tiempo duplicación, e: constante matemática e (equivale a 2,71828).

Para el tiempo de duplicación (T) se usó la Ecuación 3:

$$T = \ln(2)/r \quad (3)$$

Donde r: tasa de crecimiento exponencial.

2.3.5. Inmovilización del cultivo bacteriano con alginato de calcio

Para la inmovilización de *P. putida* ATCC 49128, se emplearon 4 tubos de ensayo con 10 mL de cultivo fresco cada uno con el cultivo de *P. putida* en caldo tripticosa de soya incubados a 37 °C durante 24 h hasta llegar a la fase exponencial (equivalente a 10^7 UFC/mL), se centrifugaron los tubos a 6,000 RPM durante 15 min.

Se colectó del precipitado de los 4 tubos y se pesaron 2,0 g (peso fresco) de biomasa fresca, que fue mezclada con 60,0 mL de una solución de alginato de sodio al 4 % p/v (Figura 10A).

La solución fue preparada usando 4 g de alginato de sodio diluido en 100 mL de agua destilada y fue esterilizado en autoclave a 121 °C, 15 psi de presión y por 15 min.

Para conseguir las esferas, se empleó una jeringa hipodérmica de 10 mL y se inyectaron gotas en una solución de cloruro de calcio 1,0 M. Las perlas de alginato de calcio con las bacterias inmovilizadas fueron homogenizadas y se pesaron 20,

40, 60 y 80 g de las perlas (Figura 10B) para ser empleadas en los diferentes tratamientos de la muestra de agua superficial del humedal (Chitiva y Dussán, 2003).

2.3.6. Elaboración del Biofiltro

El modelo del biofiltro para almacenar las perlas de alginato de calcio conteniendo a las bacterias inmovilizadas, así como, para el transporte y movimiento de las muestras de agua superficial, fue diseñado en el programa AutoCAD v.2018.



Figura 10. A. Proceso de la mezcla del alginato de calcio con biomasa de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 activas. B. Pesaje de las perlas de alginato de calcio.

El biofiltro estuvo conformado por un contenedor de acrílico de 30,0 cm de largo por 5,0 cm de diámetro, con dos orificios conectados a mangueras de entrada y salida, respectivamente. El flujo fue propulsado por una bomba para agua de 75 Watts unido a mangueras que comunican el ingreso de las muestras del humedal al contenedor por la parte inferior, siendo expulsada por la parte superior del mismo (Figura 11). El biofiltro operó en condiciones anaerobiosis.

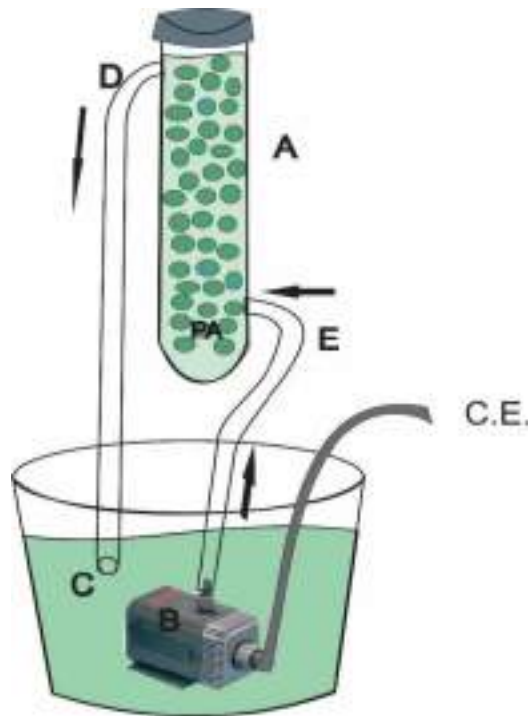


Figura 11. Diseño del biofiltro. (A) Contenedor de acrílico, (B) bomba para agua de 75 Watt, (C) depósito conteniendo la muestra de agua superficial del Humedal de Santa Rosa, (D) manguera de salida, (E) manguera de entrada, (PA) perlas de alginato conteniendo células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizadas, (CE) corriente eléctrica.

Fuente: Elaboración propia.

2.3.7. Tratamientos Experimentales

Se diseñaron cuatro tratamientos y un control con las muestras de agua superficial procedentes del humedal de Santa Rosa y para ello se filtró 1,0 L de la muestra.

La cantidad de esferas de alginato de calcio con *P. putida* inmovilizada en los biofiltros fueron las siguientes: 20,0 g para el Tratamiento 1 (T1), 40,0 g para el Tratamiento 2 (T2), 60,0 g para el Tratamiento 3 (T3) y 80,0 g para el Tratamiento 4 (T4) (Tabla 1). Para el control se emplearon 80,0 g de esferas de alginato de calcio con *P. putida* inmovilizadas en un biofiltro donde se filtró agua destilada (Tabla 1). Todas las unidades experimentales estuvieron sin la incidencia de la luz solar directa.

Tabla 1

Descripción de los tratamientos y del control en base de las muestras de agua superficial del humedal Santa Rosa y las esferas inmobilizadas conteniendo a la bacteria P. putida ATCC 49128.

Tratamientos	Descripción
T1	AC + 20 gramos de esferas con <i>P. putida</i> inmobilizada
T2	AC + 40 gramos de esferas con <i>P. putida</i> inmobilizada
T3	AC + 60 gramos de esferas con <i>P. putida</i> inmobilizada
T4	AC + 80 gramos de esferas con <i>P. putida</i> inmobilizada
CONTROL	AD + 80 gramos de esferas con <i>P. putida</i> inmobilizada

AC: aguas superficiales del humedal Santa Rosa; AD: agua destilada

Fuente: Elaboración propia.

Los tratamientos fueron aplicados durante 72 h a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Se aplicaron tres réplicas tanto para los cuatro tratamientos como para el control. Las evaluaciones se realizaron a las 0 h, 24, 36 y 72 h.

2.3.8. Evaluación de la Capacidad de Remoción de Nitrógeno Total (NT) y Fósforo Total (PT) por la Cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128 Inmobilizada en un Sistema de Filtro Continuo

Los cálculos de absorción de nitrógeno total (nitrógeno orgánico e inorgánico) y fósforo total (fósforo orgánico e inorgánico) se realizaron a partir de alícuotas de 2,0 mL de la muestra, retiradas después de 0, 24, 36 y 72 h de exposición a las perlas de alginato de calcio con células inmobilizadas de *P. putida*, de acuerdo con la metodología propuesta por Chung, Huang, C. & Tseng (1996). Todos los cálculos de absorción se realizaron por triplicado.

Se obtuvo el porcentaje de remoción de acuerdo con la Ecuación 4 (Abdel-Halim, Shehata & El-Shahat, 2003):

$$Q\% = ((C_0 - C_1) / C_0) \times 100 \quad (4)$$

Dónde: Q%: porcentaje de remoción, C_0 : concentración inicial (mg/L), C_t (mg/L): concentración en un tiempo t.

2.3.9. Unidades Experimentales

La investigación estuvo compuesta por 15 unidades experimentales y un control.

2.3.10. Identificación de Variables y su medición

Los parámetros fisicoquímicos en la investigación, según Orozco, Pérez, Gonzales, Rodríguez & Alfayate (2005), permitirá tener una información amplia de la naturaleza de las sustancias químicas y sus propiedades físicas para entender el comportamiento de los cuerpos de agua.

Tabla 2

Variable en estudio, unidades de medida y método de análisis de los parámetros fisicoquímico de las muestras de agua superficial del humedal Santa Rosa.

Variable en estudio	Unidad de Medida	Método
pH en agua	Rangos de pH	Potenciometría
Temperatura	°C	Método convencional
Conductividad	mS/cm	Conductimetría
Nitrógeno total	mg/L	Fotometría
Fósforo total	mg/L	Fotometría

Fuente: Elaboración propia.

Por lo general estas evaluaciones se deben de contrastar con las evaluaciones biológicas, por lo que muchos investigadores recomiendan la utilización de ambos en la evaluación del recurso hídrico.

Para la medición de las variables se siguieron las siguientes metodologías, que se indican en la Tabla 2.

a. Medición de pH

Para la medición del pH en la investigación se usó el potenciómetro Hanna PH211, el cual fue previamente calibrado, para posteriormente ser lavado con agua desionizada entre cada medición.

b. Medición de la Conductividad

Para la medición de conductividad se usó el conductímetro YSI 32 Digital Bench-model, previamente calibrado, cuyas unidades se indican en la Tabla 2.

c. Medición de la temperatura

Para la medición de la temperatura de las muestras se usó un termómetro de mercurio. Esta medición se realizó al inicio para corroborar la temperatura de las condiciones de laboratorio.

d. Determinación de nitrógeno total

Para el análisis de remoción de nitrógeno, se utilizó el kit para la determinación para nitrógeno total de la marca WTW® y se siguieron los siguientes pasos (WTW, 2016): (1) se vertió un mL del reactivo VARIO TN Persulfate Rgt. en una cubeta de desintegración TN Hydroxide HR, (2) se agregaron 0,5 ml de la muestra, se cerró la cubeta con el tapón roscado y se mezcló de manera enérgica durante 30 s, (3) se calentó la cubeta a 120 °C en la unidad térmica durante 30 min, (4) se sacó la cubeta de la unidad térmica, se colocó en el soporte de cubetas y se dejó enfriar, (5) se vertió un mL del reactivo VARIO TN Reagent A, se cerró la cubeta con el tapón roscado y se mezcló durante 15 s, (6) se dejó en reposo durante 3 min, (7) se vertió el contenido del reactivo de VARIO TN Reagent B, se cerró la cubeta con el tapón roscado y se mezcló durante 15 s (este paso corresponde a la muestra preparada), (8) se dejó en reposo durante 2 min, (9) se agregaron 2,0 ml de la muestra preparada en una cubeta de reacción TN Acid LR/HR (Reagent C) con una pipeta y se cerró la cubeta con el tapón

roscado, (10) se mezcló el contenido volteando cuidadosamente la cubeta (10 veces, durante 30 s) (en este paso se debe tener cuidado debido a que se produce una reacción exotérmica, por lo que la cubeta se recalienta), (11) se dejó en reposo durante 5 min, (12) se colocó la cubeta en el equipo espectrofotométrico pHotoFlex®, de la marca WTW, calibrado para el programa 320 (para nitrógeno total) (equivalente una longitud de onda de 220 nm), y se inició la medición.

e. Determinación de fósforo total

Para el análisis de remoción de fósforo, se utilizó el kit para la determinación para fósforo total de la marca WTW® y se siguieron los siguientes pasos (WTW, 2016): (1) se llenó con una pipeta 5,0 ml de la muestra en una cubeta de reacción, (2) se añadió el contenido del reactivo VARIO Potassium Persulfate F10 y se cerró la cubeta con el tapón roscado, (3) se sacudió de manera enérgica la cubeta para diluir las partículas sólidas, (4) se calentó la cubeta en la unidad térmica a 120 °C durante 30 min, (5) se sacó la cubeta de la unidad térmica, se colocó en el soporte de cubetas y se dejó que se enfríe, (6) se agregó con una pipeta 2,0 ml de una solución 1,54 N de NaOH, se cerró la cubeta con el tapón roscado y se mezcló el contenido de la cubeta con cuidado varias veces, (7) se añadió el contenido del reactivo VARIO Phos 3 F10 y se cerró la cubeta con el tapón roscado, (8) se sacudió la cubeta de manera enérgica durante 10 a 15 s, (9) se dejó en reposo durante 2 min, (10) se colocó la cubeta en el equipo espectrofotométrico pHotoFlex®, de la marca WTW, y se hizo la medición a una longitud de onda de 420 nm, y se inició la medición.

2.3.11. Diseño de la Investigación

La presente investigación es de tipo experimental, en donde se empleó la cepa bacteriana *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizadas en una matriz de alginato de calcio para la remoción de nitrógeno y fósforo total presentes en una muestra de agua superficial provenientes del humedal de Santa Rosa.

2.3.12. Análisis de Datos

La diferencia entre los tiempos expuestos de *P. putida* ATCC 49128 a las muestras de agua superficial del humedal de Santa Rosa y los diferentes porcentajes de remoción fueron evaluados mediante un análisis de la varianza tanto para la remoción de N total y P total. También se realizó el análisis de varianza unifactorial entre el peso de las esferas y los diferentes porcentajes de remoción de los nutrientes. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como significativo.

Se analizó la correlación entre los parámetros fisicoquímicos (NT, PT, conductividad y pH) evaluados para determinar las variables más influyentes en la investigación.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. RESULTADOS

3.1.1. Características Físicoquímicas Iniciales de Muestras de Agua Superficial del Humedal de Santa Rosa

Las muestras de agua superficial del humedal de Santa Rosa fueron trasladadas al Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la UCSS. Se analizaron cinco parámetros físicoquímicos iniciales (nitrógeno total, fósforo total, pH, conductividad y temperatura) en condiciones de laboratorio, con mediciones de las muestras por triplicado. Los resultados obtenidos muestran valores iniciales de nitrógeno total de 7,12 mg/L, fósforo total de 1,30 mg/L, pH 8,2 (alcalino), conductividad de 40,0 mS/cm y temperatura de 21,5 °C (Tabla 3).

Tabla 3

Valores promedio de los parámetros correspondientes al análisis físicoquímico de la muestra de agua superficial del humedal de Santa Rosa (Chancay, Lima)

Parámetros	Unidades	Resultado
Nitrógeno total	mg/L	7,12±0,05
Fósforo total	mg/L	1,30±0,005
pH		8,2±0,01
Conductividad	mS/cm	40,0±0,12
Temperatura	°C	21,5±0,01

Fuente: Elaboración propia.

3.1.2. Resultados de la Cinética de Crecimiento de *Pseudomonas putida* ATCC 49128

Se realizó el conteo de colonias desde las 7.5 h hasta las 24 h de cultivo, mostrando un aumento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) hasta las 22 h (Apéndice 1).

La Figura 12 muestra la curva de crecimiento exponencial de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 y el análisis de la curva de regresión exponencial. La ecuación exponencial ($y = 18.247e^{0.0542x}$) reveló un elevado valor del coeficiente de determinación ($R^2=0,9649$), lo que indica un buen ajuste del modelo de regresión. La fase de inmovilización celular se realizó cuando el cultivo alcanzó una tasa exponencial máxima de crecimiento de $0,059 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 11,74 h, siendo la población bacteriana utilizada en la inmovilización de 63×10^7 UFC/mL, correspondientes a las 22 h de crecimiento bacteriano, porque representa el máximo crecimiento exponencial (Figura 13).

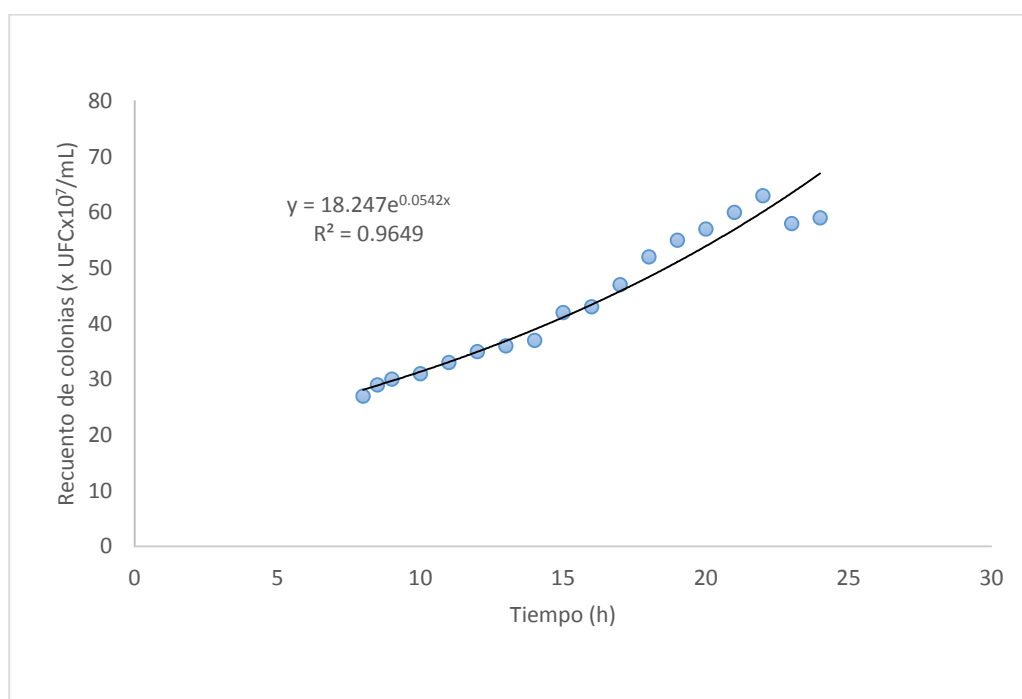


Figura 12. Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* ATCC 49128.

Parámetros cinéticos de crecimiento	}	r (h^{-1})	:	0,0592
		T_2 (h)	:	11.74
		Densidad celular máx.	:	63×10^7 UFC/mL
Valor de $R^2 = 0,9649$				

Figura 13. Parámetros cinéticos de crecimiento durante la fase exponencial para inmovilización de *Pseudomonas putida* ATCC 49128.

3.1.3. Variación Promedio de la Concentración del Nitrógeno total

La concentración inicial (a las 0 h) de nitrógeno total (N total) en las muestras de agua superficial en todos los tratamientos fue de $7,12 \pm 0,05$ mg/L. En la Tabla 4 y Figura 14 se observan las mediciones a diferentes tiempos (desde las 12 h hasta las 72 h) del N total en los cuatro tratamientos (T1 al T4) y el control. Los resultados muestran que los valores del N total disminuyeron en todos los tratamientos a las 72 h. En el control, los valores oscilaron desde las 12 hasta las 72 h, con un mínimo de $1,05 \pm 0,01$ mg/L y un máximo de $1,80 \pm 0,02$ mg/L (Tabla 4). El tratamiento donde se obtuvo la mayor remoción de N total fue el tratamiento (T3, donde a las 72 h de evaluación se logró un valor mínimo de $0,80 \pm 0,10$ mg/L de NT. En los demás tratamientos, en el mismo tiempo de evaluación, la remoción fue inferior, los valores de NT en el tratamiento 1 (T1) fue de $4,2 \pm 0,07$ mg/L, en el tratamiento 2 (T2) $3,00 \pm 0,05$ mg/L y tratamiento 4 (T4) $5,50 \pm 0,01$ mg/L (Tabla 4, Figura 14).

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) muestran que la concentración de N total mantuvo un comportamiento variable significativo ($p < 0,0001$) en las diferentes horas evaluadas y en los diferentes tratamientos ($p < 0,001$) (Tabla 5). La prueba de Tukey mostró que todas las horas evaluadas presentaron diferencias significativas a la variación de N total presente en las muestras de agua superficial del humedal tratadas con el biofiltro ($p < 0,001$) (Apéndice 2).

Tabla 4

Valores de las concentraciones obtenidas de nitrógeno total (mg/L) con las desviaciones estándares ($\pm DS$) en los tratamientos y el control durante 72 h de exposición a las perlas de alginato de calcio con *P. putida* inmovilizada

Tratamientos	Tiempo (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
T1		6,33	6,12	6,01	5,60	4,87	4,20
		6,30	6,12	5,81	5,51	4,93	4,27
		6,31	6,15	6,23	5,32	4,60	4,13
Promedio	7,12 \pm 0,05	6,31\pm0,02	6,13\pm0,02	6,02\pm0,21	5,48\pm0,14	4,80\pm0,18	4,20\pm0,07
T2		4,56	3,20	3,00	3,07	3,05	3,05
		4,52	3,32	3,21	3,10	3,07	3,00
		4,46	3,16	3,10	3,05	3,20	2,95
promedio	7,12 \pm 0,05	4,51\pm0,05	3,23\pm0,08	3,10\pm0,11	3,07\pm0,03	3,11\pm0,08	3,00\pm0,05
T3		5,12	4,00	3,20	2,60	1,11	0,90
		5,10	4,00	3,00	2,81	1,02	0,71
		5,13	3,90	3,13	2,95	0,90	0,80
promedio	7,12 \pm 0,05	5,12\pm0,02	3,97\pm0,06	3,11\pm0,10	2,79\pm0,18	1,01\pm0,11	0,80\pm0,10
T4		6,50	6,55	6,50	5,80	5,60	5,50
		6,70	6,40	6,51	5,82	5,67	5,51
		6,94	6,50	6,49	5,77	5,59	5,50
promedio	7,12 \pm 0,05	6,71\pm0,22	6,48\pm0,08	6,50\pm0,01	5,80\pm0,03	5,62\pm0,04	5,50\pm0,01
Control	0,00 \pm 0	1,05 \pm 0,01	1,10 \pm 0,09	1,60 \pm 0,04	1,80 \pm 0,02	1,30 \pm 0,01	1,30 \pm 0,09

Fuente: Elaboración propia.

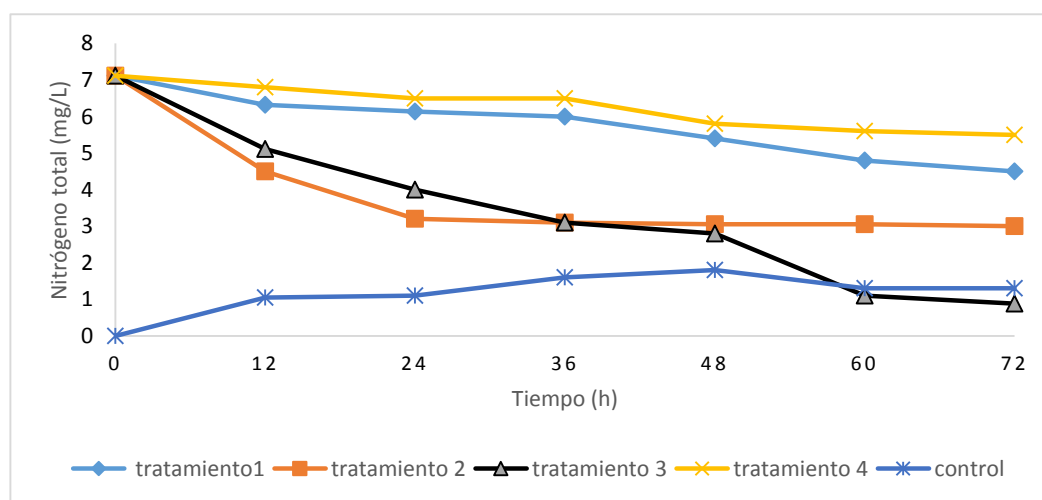


Figura 14. Resultado de los valores de nitrógeno total (mg/L) en los cuatro tratamientos y el control durante 72 horas evaluadas.

Tabla 5

Análisis de la varianza de las concentraciones de nitrógeno total en los tratamientos y horas evaluadas

ANOVA					
Variable dependiente: NITRÓGENO TOTAL					
Origen	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	364,361 ^a	27	13,495	413,382	0,000
Intersección	1776,842	1	1776,842	54429,324	0,000
TRATAMIENTO	165,969	3	55,323	1694,686	0,000
HORAS	154,633	6	25,772	789,467	0,000
TRATAMIENTO	43,760	18	2,431	74,470	0,000
* HORAS					
Error	1,828	56	0,033		
Total	2143,031	84			

a. R al cuadrado = 0,995 (R al cuadrado ajustada = 0,993)

Fuente: Elaboración propia.

3.1.4. Porcentaje de Remoción de Nitrógeno Total

La Tabla 6 muestra los valores promedios de los porcentajes de remoción de nitrógeno total (N total) obtenidos en los cuatro tratamientos con células inmovilizadas de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 y a las distintas horas evaluadas.

El porcentaje de remoción de N total en el tratamiento 1 (T1) fue de $11,33 \pm 0,21\%$ para las primeras 12 h y se incrementó paulatinamente hasta las 72 h, lográndose un porcentaje de remoción final de $41,01 \pm 0,98\%$, mientras que el tratamiento 2 (T2) mostró un valor promedio de $36,61 \pm 0,71\%$ a las 12 h y $57,87 \pm 0,70\%$ a las 72 h (Tabla 6, Figura 15). El tratamiento 3 (T3) reveló un valor promedio de $28,14 \pm 0,21\%$ a las 12 h y $88,72 \pm 1,33\%$ a las 72 h, por lo que fue el tratamiento que logró la mayor remoción de N total a las 72 h (Tabla 6, Figura 15). El tratamiento 4 (T4) presentó el valor más bajo de porcentaje de remoción de NT con un valor promedio de $5,71 \pm 3,09\%$ a las 12 h y $22,71 \pm 0,08\%$ a las 72 h (Tabla 6, Figura 15).

Tabla 6

Valores promedios de la remoción (%) de nitrógeno total obtenidos en los cuatros tratamientos y a las distintas horas evaluadas

	Tiempo (h)					
	12	24	36	48	60	72
Tratamiento 1	11,33±0,21	13,90±0,24	15,50±2,95	23,08±2,01	32,58±2,47	41,01±0,98
Tratamiento 2	36,61±0,71	54,68±1,17	56,41±1,48	56,84±0,35	56,37±1,14	57,87±0,70
Tratamiento 3	28,14±0,21	44,29±0,81	56,32±1,43	60,86±2,47	85,81±1,48	88,72±1,33
Tratamiento 4	5,71±3,09	8,94±1,07	8,71±0,14	18,59±0,35	21,07±0,61	22,71±0,08

Fuente: Elaboración propia.

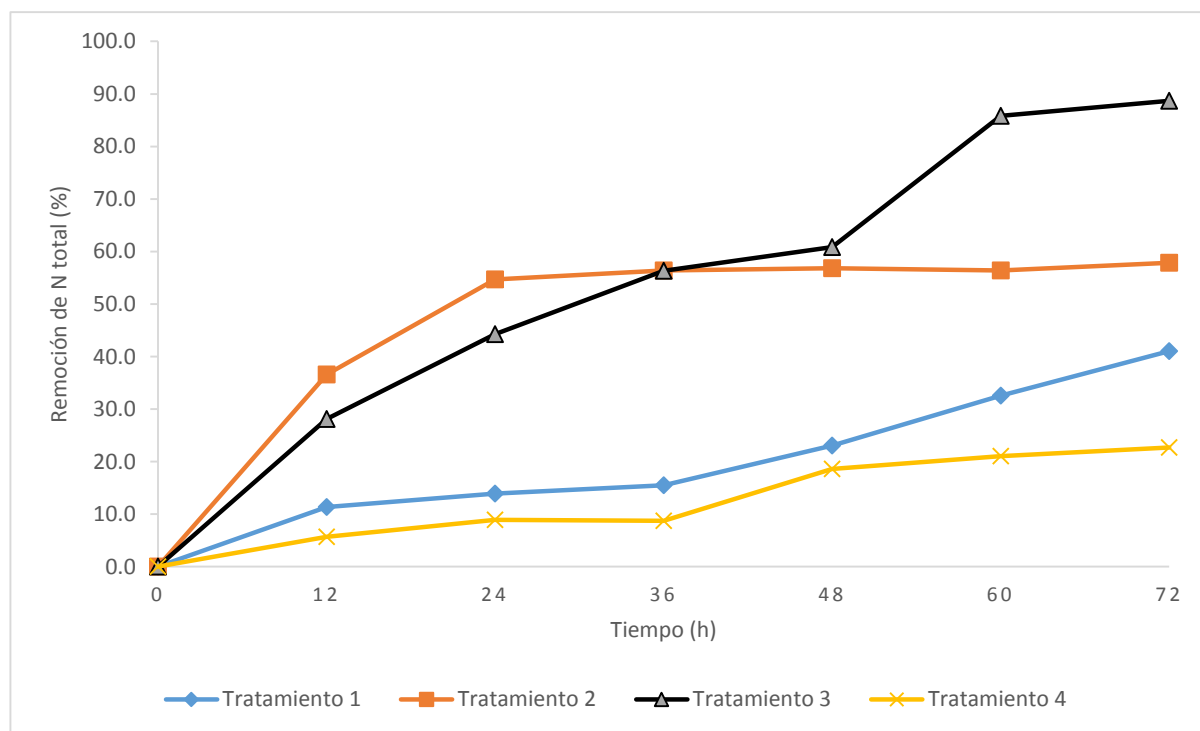


Figura 15. Resultado de los porcentajes promedio de remoción de nitrógeno total en los cuatro tratamientos durante las 72 horas evaluadas.

Tabla 7

Análisis de la varianza de la remoción (%) del nitrógeno total en los tratamientos y horas evaluadas

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: REMOCIÓN DE NITRÓGENO TOTAL					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	35435,563 ^a	17	2084,445	20487,809	0,000
Intersección	135144,038	1	135144,038	1328317,815	0,000
TRATAMIENTOS	20744,527	2	10372,264	101947,987	0,000
H	12698,043	5	2539,609	24961,570	0,000
TRATAMIENTOS	1992,992	10	199,299	1958,893	0,000
* H					
Error	3,663	36	0,102		
Total	170583,264	54			
Total corregido	35439,226	53			

a. R al cuadrado = 1,000 (R al cuadrado ajustada = 1,000)

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) muestran que el porcentaje de remoción de N total en los tratamientos presentan diferencias significativas ($p=0,000$) y una alta relación entre ellas al ser contrastadas con las variables F ($F=101947,987$) (Tabla 7).

3.1.5. Variación Promedio de la Concentración de Fósforo total

La concentración inicial (a las 0 h) de fósforo total (P total) en las muestras de agua superficial en todos los tratamientos fue de $1,30 \pm 0,005$ mg/L. En la Tabla 8 y Figura 16 se muestran las mediciones a diferentes tiempos (desde las 12 h hasta las 72 h) del P total en los cuatro tratamientos (T1 al T4) y el control. Los resultados muestran que los valores del P total disminuyeron en todos los tratamientos a los 72 h. En el control, los valores no revelaron cambios desde las 12 hasta las 72 h, todos con $< 0,005$ mg/L (Tabla 8).

El tratamiento 3 (T3) logró un valor mínimo de $0,66\pm 0,09$ mg/L a las 72 h de evaluación, el tratamiento 4 (T4) fue el segundo que mostro un menor valor de PT con $1,21\pm 0,01$ mg/L. En los demás tratamientos, en el mismo tiempo de evaluación, para el tratamiento 1 (T1) fue la cantidad de $1,10\pm 0,04$ mg/L y para el tratamiento (T2) fue de $1,21\pm 0,01$ mg/L (Tabla 8, Figura 16).

Tabla 8

*Valores de las concentraciones obtenidas de fósforo total (mg/L) con las desviaciones estándares (\pm DS) en los tratamientos y el control durante 72 h de exposición a las perlas de alginato de calcio con *P. putida* inmovilizada*

Tratamientos	Tiempo (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
T1		1,10	0,92	1,16	1,26	1,0	1,10
		1,09	0,99	1,2	1,20	1,1	1,14
		1,12	1,07	1,23	1,19	1,05	1,07
		1,30\pm0,005	1,10\pm0,02	0,99\pm0,08	1,20\pm0,04	1,22\pm0,04	1,05\pm0,05
T2		1,22	1,17	1,21	1,20	1,21	1,20
		1,24	1,20	1,19	1,17	1,21	1,21
		1,19	1,15	1,23	1,19	1,21	1,21
		1,30\pm0,005	1,22\pm0,03	1,17\pm0,03	1,21\pm0,02	1,18\pm0,01	1,21\pm0,00
T3		1,40	1,00	1,0	0,78	0,6	0,67
		1,10	1,10	0,8	0,81	0,56	0,66
		0,70	1,05	0,5	0,73	0,70	0,65
		1,30\pm0,005	1,07\pm0,35	1,05\pm0,05	0,77\pm0,25	0,77\pm0,04	0,62\pm0,07
T4		1,40	1,05	1,05	0,87	0,91	0,76
		0,80	1,10	1,00	0,89	0,88	0,78
		1,10	1,08	0,97	0,88	0,77	0,77
		1,30\pm0,005	1,10\pm0,30	1,08\pm0,03	1,01\pm0,04	0,88\pm0,01	0,85\pm0,07
Control	0,00	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005

Fuente: Elaboración propia.

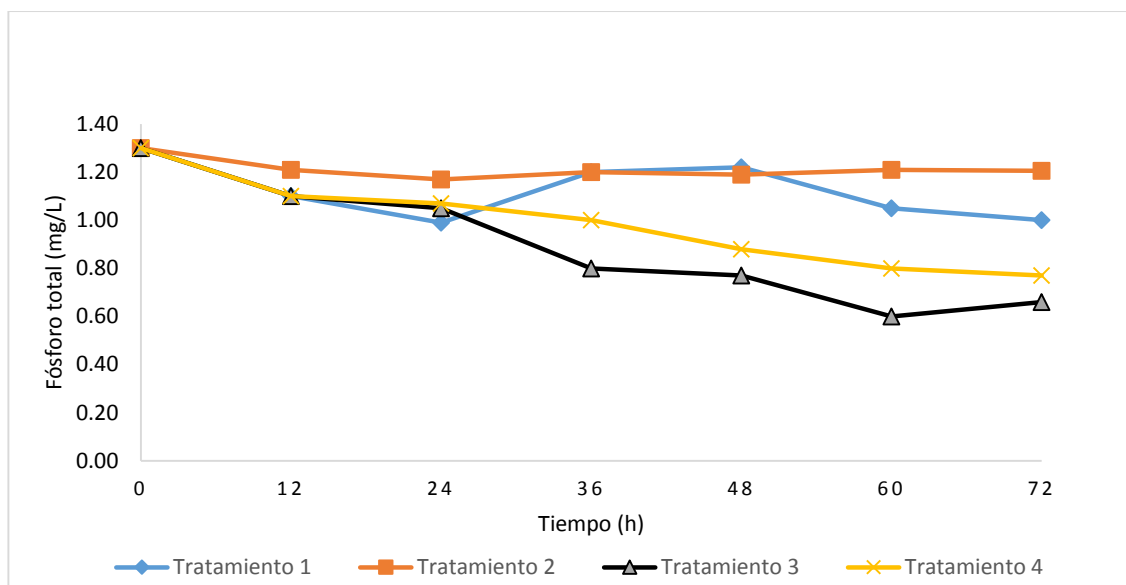


Figura 16. Resultado de los valores de fósforo total (mg/L) en los cuatro tratamientos durante las 72 horas evaluadas.

Tabla 9

Análisis de la varianza de las concentraciones de fósforo total en los tratamientos y horas evaluadas

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: FÓSFORO TOTAL					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	16,035 ^a	23	0,697	14,910	0,000
Intersección	26,632	1	26,632	569,576	0,000
TRATAMIENTOS	6,157	3	2,052	43,892	0,000
HORAS	2,411	5	0,482	10,315	0,000
TRATAMIENTOS * HORAS	7,467	15	0,498	10,646	0,000
Error	2,244	48	0,047		
Total	44,911	72			
Total corregido	18,279	71			

a. R al cuadrado = 0,877 (R al cuadrado ajustada = 0,818)

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) muestran que la concentración de P total mantuvo un comportamiento variable en las diferentes horas evaluadas ($p < 0,001$) y en los diferentes tratamientos ($p < 0,001$) (Tabla 9).

La prueba de Tukey mostró tres (3) subconjuntos homogéneos para la variación de la concentración de PT en función de las horas. El primero de ellos a 60, 72 y 48 horas, no presentaron diferencias ($p = 0,12$). El subconjunto dos (2) conformados por los 48 y 72 horas, no mostraron diferencias significativas en la variación de la concentración de P total; así como el subconjunto tres (3) conformado por las 12, 32 y 48 horas no mostraron diferencias significativas ($p = 0,074$) (Apéndice 3).

3.1.6. Porcentaje de Remoción del Fósforo Total

La Tabla 10 muestra los valores promedios de los porcentajes de remoción de fósforo total (P total) obtenidos en los cuatro tratamientos con células inmovilizadas de *P. putida* ATCC 49128 y a las distintas horas evaluadas.

El porcentaje de remoción de P total en el tratamiento 1 (T1) fue de $15,13 \pm 1,18\%$ para las primeras 12 h, osciló entre las 24 y 60 h, con valores mínimos y máximos de $7,95 \pm 2,70\%$ y $23,59 \pm 5,77\%$, respectivamente, hasta llegar a $15,13 \pm 2,70\%$ a las 72 h (Tabla 10, Figura 17). El tratamiento 2 (T2) presentó el menor porcentaje de remoción con un valor promedio de $6,41 \pm 1,94\%$ a las 12 h y $7,18 \pm 0,44\%$ a los 72 h. El tratamiento 3 (T3) mostró un valor promedio de $17,95 \pm 27,01\%$ a las 12 h y $49,23 \pm 0,77\%$ a las 72 h, por lo que fue el tratamiento que logró la mayor remoción de P total a las 72 h. El tratamiento 4 (T4) reveló un valor promedio de $15,38 \pm 23,08\%$ a las 12 h y $40,77 \pm 0,77\%$ a las 72 h (Tabla 10, Figura 17).

Tabla 10

Valores promedios de los porcentajes de la remoción de fósforo total obtenidos en los cuatro tratamientos a las distintas horas evaluadas

	Tiempo (h)					
	12	24	36	48	60	72
Tratamiento 1	15,13±1,18	23,59±5,77	7,95±2,70	6,41±2,91	19,23±3,85	15,13±2,70
Tratamiento 2	6,41±1,94	9,74±1,94	6,92±1,54	8,72±1,18	6,90±0,04	7,18±0,44
Tratamiento 3	17,95±27,01	19,23±3,85	41,03±19,36	40,51±3,11	52,31±5,55	49,23±0,77
Tratamiento 4	15,38±23,08	17,18±1,94	22,56±3,11	32,31±0,77	34,36±5,67	40,77±0,77

Fuente: Elaboración propia.

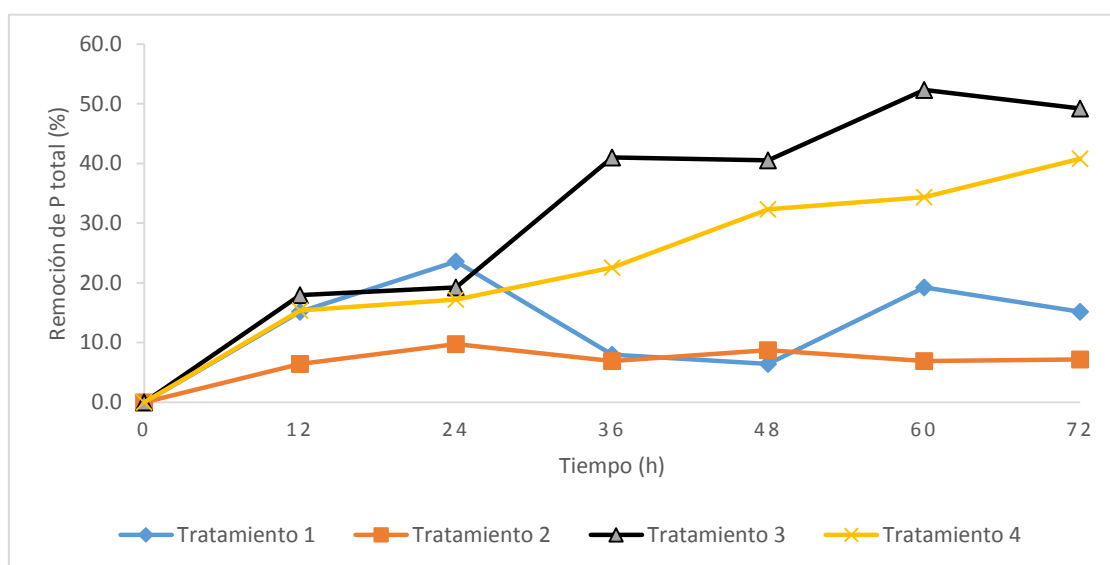


Figura 17. Resultado de los valores promedio de los porcentajes de remoción de fósforo total (%) en los cuatro tratamientos durante 72 horas evaluadas.

El tratamiento 2 (T2) presentó el valor más bajo de porcentaje de remoción con un valor promedio de 6,41±1,94% a las 12 h y 7,18±0,44% a las 72 h (Tabla 10, Figura 17). El tratamiento 3 (T3) mostró un valor promedio de 17,95±27,01% a las 12 h y 49,23±0,77% a las 72 h, por lo que fue el tratamiento que logró la mayor remoción de P total a las 72 h (Tabla 10, Figura 17). El tratamiento 4 (T4) reveló un valor

promedio de $15,38 \pm 23,08\%$ a las 12 h y $40,77 \pm 0,77\%$ a las 72 h (Tabla 10, Figura 17).

Tabla 11

Análisis de la varianza de los porcentajes la remoción del fósforo total en los tratamientos y horas evaluadas

Pruebas de los efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: REMOCIÓN DE FÓSFORO TOTAL					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	14665,472 ^a	23	637,629	5073,300	0,000
Intersección	34847,120	1	34847,120	277261,265	0,000
TRATAMIENTOS	8323,775	3	2774,592	22076,052	0,000
H	2764,908	5	552,982	4399,800	0,000
TRATAMIENTOS * H	3576,789	15	238,453	1897,249	0,000
Error	6,033	48	0,126		
Total	49518,624	72			
Total corregida	14671,504	71			

a. R cuadrado = 1,000 (R cuadrado corregida = 0,999)

Fuente: Elaboración propia.

En Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) muestran diferencias significativas ($p=0,00$), entre el porcentaje de remoción de PT y los tratamientos; así como una diferencias significativa ($p=0,00$) entre el porcentaje de remoción de PT y las horas evaluadas (Tabla 11).

3.1.7. Variación del pH

El valor inicial (a las 0 h) de pH en las muestras de agua superficial del humedal en todos los tratamientos fue de $8,20 \pm 0,01$. En la Tabla 12 y Figura 18 se observan las mediciones a diferentes tiempos (desde las 12 h hasta las 72 h) del pH en los cuatro tratamientos (T1 al T4) y el control. Los resultados muestran que los valores del pH se incrementaron en todos los tratamientos a las 72 h, con excepción del tratamiento 1 (T1) y el tratamiento 3 (T3) (Tabla 12, Figura 18). El rango del valor del pH del control fue de 7,05 a 8,11 a las 72 horas.

En todos los tratamientos se observó la disminución del pH a las 12 h (T1: $8,18 \pm 0,02$, T2: $8,16 \pm 0,01$, T3: $7,89 \pm 0,10$ y T4: $8,05 \pm 0,05$), con respecto al valor inicial (Tabla 12, Figura 18). Sin embargo, en cada uno de los tratamientos los valores de pH fluctuaron a lo largo de todo el experimento.

Tabla 12

Valores promedios del pH obtenido en los cuatro tratamientos y el control a las distintas horas evaluadas

Tratamientos	Tiempo (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
T1		8,20	8,19	8,22	8,33	8,22	8,15
		8,18	8,19	8,27	8,33	8,25	8,16
		8,16	8,18	8,25	8,34	8,21	8,16
		8,20±0,01	8,18±0,02	8,19±0,01	8,25±0,03	8,33±0,01	8,22±0,02
T2		8,16	7,98	8,15	8,09	8,30	8,30
		8,15	8,01	8,15	8,05	8,10	8,40
		8,16	7,96	8,16	8,07	8,20	8,45
		8,20±0,01	8,16±0,01	7,98±0,03	8,15±0,01	8,07±0,02	8,20±0,10
T3		7,89	7,94	7,72	7,88	8,16	8,20
		7,80	7,95	7,74	7,82	8,10	8,25
		7,99	7,95	7,76	7,85	8,16	8,00
		8,20±0,01	7,89±0,10	7,95±0,01	7,74±0,02	7,85±0,03	8,14±0,03
T4		8,00	8,04	8,06	8,00	7,84	8,20
		8,10	8,05	8,00	8,00	7,94	8,40
		8,05	8,04	7,94	7,96	7,87	8,30
		8,20±0,01	8,05±0,05	8,04±0,01	8,0±0,06	7,98±0,02	7,88±0,05
Control	7,00	7,05	7,40	7,95	8,00	8,10	8,11

Fuente: Elaboración propia.

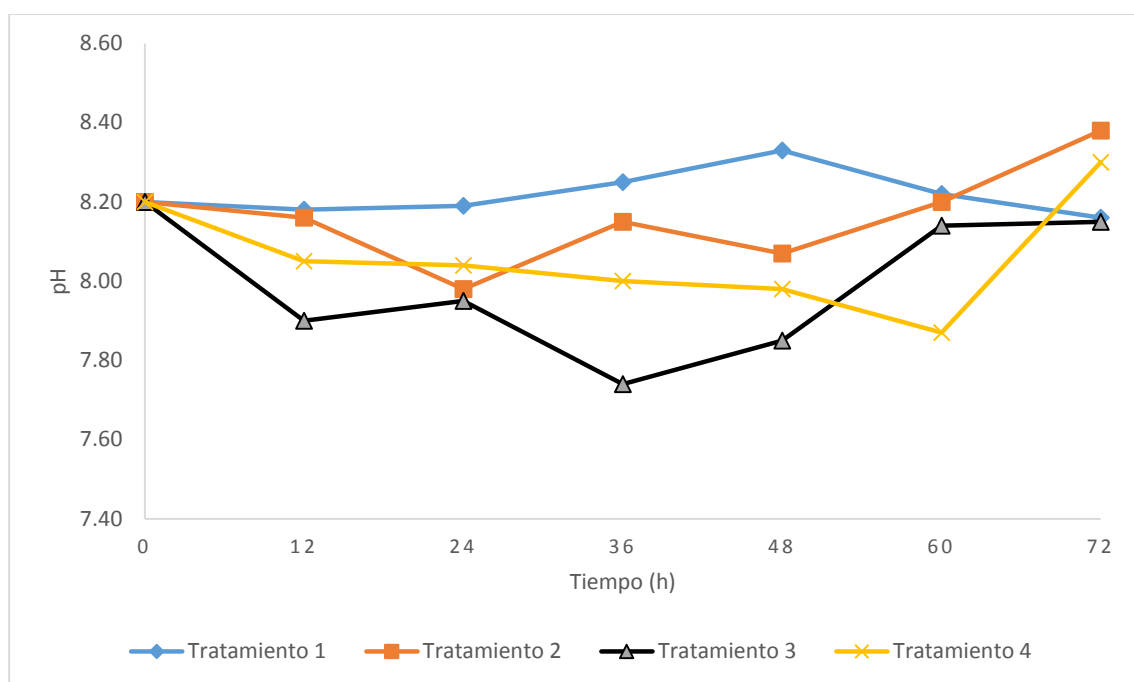


Figura 18. Resultado de los valores promedio de pH en los cuatro tratamientos durante 72 horas evaluadas.

Los tratamientos 2, 3 y 4 (T2, T3 y T4) mostraron un incremento del pH a las 72 h, con valores finales de $8,38\pm 0,08$, $8,15\pm 0,13$ y $8,30\pm 0,10$, respectivamente (Tabla 12, Figura 18). El tratamiento 1 (T1) disminuyó a $8,16\pm 0,01$ a las 72 h (Tabla 12, Figura 18).

3.1.8. Análisis de la Variación de la Conductividad

La concentración inicial (a las 0 h) de conductividad en las muestras de agua superficial del humedal en todos los tratamientos fue de $40,00\pm 0,12$ mS/cm. En la Tabla 13 y Figura 19 se observan las mediciones a diferentes tiempos (desde las 12 h hasta las 72 h) de la conductividad en los cuatro tratamientos (T1 al T4) y el control.

Tabla 13

Valores promedios de la Conductividad (mS/cm) obtenidos en los cuatro tratamientos a las distintas horas evaluadas (promedio \pm D.S)

		Tiempo (h)					
Tratamientos	0	12	24	36	48	60	72
T1		40,10	47,00	50,00	54,80	50,10	37,30
		41,00	47,00	51,00	56,00	48,00	39,00
		39,80	46,90	50,00	54,50	48,90	37,90
	40,00 \pm 0,12	40,30\pm0,62	46,97\pm0,06	50,33\pm0,58	55,10\pm0,79	49,00\pm1,05	38,07\pm0,86
T2		43,00	33,00	41,1	40,00	45,00	45,20
		41,00	35,20	45,00	41,00	47,20	46,00
		45,00	31,00	42,90	37,90	43,00	46,50
	40,00 \pm 0,12	43,00\pm2,00	33,07\pm2,10	43,00\pm1,95	39,63\pm1,58	45,07\pm2,10	45,90\pm0,66
T3		31,80	29,00	33,20	35,00	43,20	48,20
		29,80	29,00	31,00	36,00	43,10	46,00
		28,50	29,10	34,80	34,10	43,00	49,80
	40,00 \pm 0,12	30,03\pm1,66	29,03\pm0,06	33,00\pm1,91	35,03\pm0,95	43,10\pm0,10	48,00\pm1,91
T4		36,00	36,50	36,00	34,00	29,00	25,00
		34,20	36,00	36,20	35,00	26,50	26,50
		35,10	36,18	36,40	34,91	27,90	23,50
	40,00 \pm 0,12	35,10\pm0,90	36,23\pm0,25	36,20\pm0,20	34,64\pm0,55	27,80\pm1,25	25,00\pm1,50
CONTROL	0,13	1,03	1,27	1,53	1,63	2,77	3,10

		Tiempo (h)					
Tratamientos	0	12	24	36	48	60	72
T1		40,10	47,00	50,00	54,80	50,10	37,30
		41,00	47,00	51,00	56,00	48,00	39,00
		39,80	46,90	50,00	54,50	48,90	37,90
	40,00 \pm 0,12	40,30\pm0,62	46,97\pm0,06	50,33\pm0,58	55,10\pm0,79	49,00\pm1,05	38,07\pm0,86
T2		43,00	33,00	41,1	40,00	45,00	45,20
		41,00	35,20	45,00	41,00	47,20	46,00
		45,00	31,00	42,90	37,90	43,00	46,50
	40,00 \pm 0,12	43,00\pm2,00	33,07\pm2,10	43,00\pm1,95	39,63\pm1,58	45,07\pm2,10	45,90\pm0,66
T3		31,80	29,00	33,20	35,00	43,20	48,20
		29,80	29,00	31,00	36,00	43,10	46,00
		28,50	29,10	34,80	34,10	43,00	49,80
	40,00 \pm 0,12	30,03\pm1,66	29,03\pm0,06	33,00\pm1,91	35,03\pm0,95	43,10\pm0,10	48,00\pm1,91
T4		36,00	36,50	36,00	34,00	29,00	25,00
		34,20	36,00	36,20	35,00	26,50	26,50
		35,10	36,18	36,40	34,91	27,90	23,50
	40,00 \pm 0,12	35,10\pm0,90	36,23\pm0,25	36,20\pm0,20	34,64\pm0,55	27,80\pm1,25	25,00\pm1,50
CONTROL	0,13	1,03	1,27	1,53	1,63	2,77	3,10

Fuente: Elaboración propia.

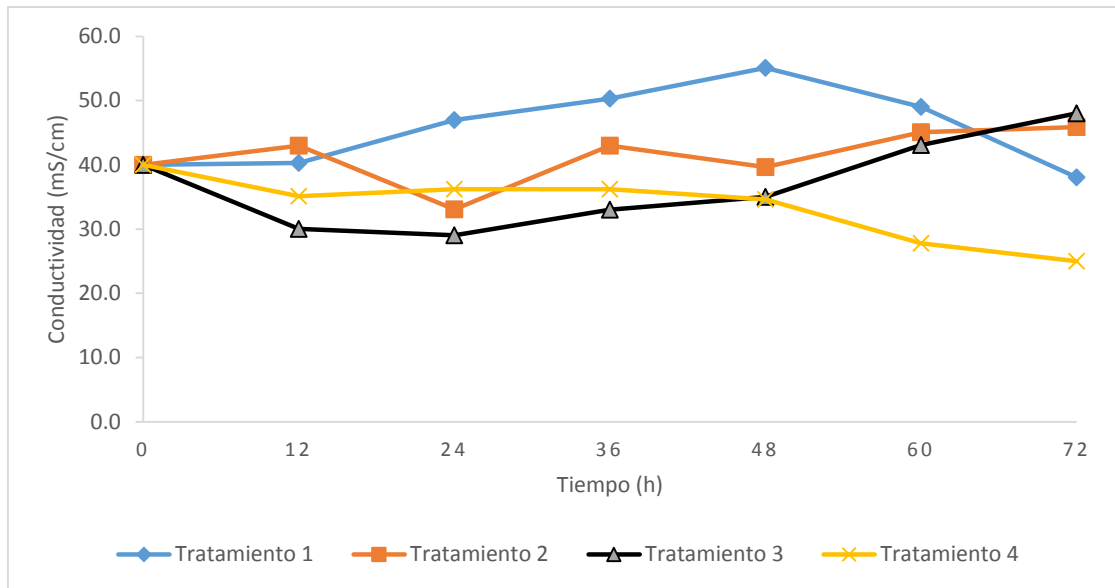


Figura 19. Resultado de los valores promedio de la conductividad (mS/cm) en los cuatro tratamientos durante 72 horas evaluadas.

Los resultados muestran que los valores de la conductividad se incrementaron en los tratamientos 2 y 3 (T2 y T3) a las 72 h, a diferencia de los tratamientos 1 y 4 (T1 y T4) (Tabla 13, Figura 19). En el control, los valores aumentaron desde las 12 hasta las 72 h, con un mínimo de 1,03 mS/cm y un máximo de 3,10 mS/cm (Tabla 13). En los tratamientos 3 y 4 se observó la disminución de la conductividad a las 12 h (T3: $30,03 \pm 1,66$ mS/cm y T4: $35,10 \pm 0,90$ mS/cm), con respecto al valor inicial (Tabla 13, Figura 19). Los tratamientos 1 y 2 (T1: $40,30 \pm 0,62$ mS/cm, T2: $43,00 \pm 2,00$ mS/cm) revelaron un comportamiento opuesto a las 12 h, ya que se incrementaron con respecto al valor inicial (Tabla 13, Figura 19). Los tratamientos 1 y 4 (T1 y T4) mostraron una disminución de la conductividad a las 72 h con respecto a las 12 h, con valores finales de $38,07 \pm 0,86$ mS/cm y $25,00 \pm 1,50$ mS/cm, respectivamente (Tabla 13, Figura 19). Luego de las 72 h de evaluación, los resultados muestran que los valores de la conductividad se incrementaron en los tratamientos 2 y 3 (T2: $45,90 \pm 0,66$ mS/cm y T3: $48,00 \pm 1,91$ mS/cm), a diferencia de los tratamientos 1 y 4 (T1: $38,07 \pm 0,86$ mS/cm y T4: $25,00 \pm 1,50$ mS/cm) que disminuyeron (Tabla 13, Figura 19). En el control, los valores aumentaron a lo largo del experimento, desde 1,03 mS/cm a las 12 hasta 3,10 mS/cm a las 72 h (Tabla 13).

3.1.9. Análisis de la Correlación de Pearson

El índice de correlación de Pearson, empleado para determinar las relaciones entre los valores promedio de nitrógeno total (N total), fósforo total (P total), conductividad y pH (Tabla 14).

Se encontraron correlaciones positivas entre N total y P total ($r=0,282$; $p=0,016$), entre P total y los valores de la conductividad ($r=0,334$; $p=0,004$) y entre P total y los valores de pH ($r=0,218$; $p=0,06$) (Tabla 14). Sin embargo, se hallaron correlaciones negativas entre N total y la conductividad ($r= -0,169$; $p=0,157$) y N total y los valores de pH ($r= -0,104$; $p=0,385$) (Tabla 14).

Tabla 14

Coefficientes de correlación lineal de Pearson (r) entre los valores de Nitrógeno total, Fósforo total, Conductividad y pH

		Correlaciones			
		Nitrógeno	Conductividad	Fósforo	pH
Nitrógeno	Correlación de Pearson	1	-0,169	0,282*	-0,104
	Sig. (bilateral)		0,157	0,016	0,385
Conductividad	Correlación de Pearson		1	0,334**	0,416**
	Sig. (bilateral)			0,004	0,000
Fósforo	Correlación de Pearson			1	0,218
	Sig. (bilateral)				0,066

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Fuente: Elaboración propia.

3.2. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación es el primer estudio en Perú en evaluar la remoción de nitrógeno (N) total y fósforo (P) total presentes en las muestras de agua superficial del humedal de Santa Rosa mediante el uso de un biofiltro conteniendo poblaciones de la bacteria *Pseudomonas putida* ATCC 49128. Esta bacteria ha sido reconocida como un organismo heterotrófico ubicuo y que posee la capacidad de utilizar diversos sustratos (López et al., 2006).

Se han reportado investigaciones sobre bacterias heterotróficas cultivables, que pueden remover el nitrógeno (N) en diferentes condiciones ambientales, tanto aerobios estrictos como las especies *Nitrosomonas sp.*, *Nitrosovibrio sp.*, *Nitrosococcus sp.*, *Nitrosolobus sp.* y *Nitrospira sp.* (Matsuba et al., 2003) y facultativas que generalmente desnitrifican en ausencia de oxígeno, como *Pseudomonas denitrificans* y *Paracoccus denitrificans* (Holt, Krieg, Snealth, Staley & Williams, 1994). Similares reportes existen para *Bacillus sp.* (Kim et al., 2005), *Pseudomonas stutzeri* (Zhang, Wu, Hao & Yu 2011), *Rhodococcus sp.* (Chen et al., 2012) y *Acinetobacter calcoaceticus* (Yao, Ni, Ma & Li, 2013).

Los resultados mostraron que la remoción de N total fue 52.58 % en promedio ($3,38 \pm 1,81$ mg/L) para todos los tratamientos a las 72 h, mientras que los valores más altos de remoción de N total que se registró fueron en el Tratamiento 3 (60 g de esferas de alginato de calcio con *P. putida* inmovilizada) a las 60 h y 72 h, con un 85,81 % ($1,01 \pm 0,11$ mg/L) y 88,72% ($0,80 \pm 0,10$ mg/L) de remoción, respectivamente. Este resultado es comparable con otros estudios, como los reportados por Zaballa et al. (2016), quienes emplearon *Pseudomonas pseudoalcaligenes* inmovilizadas en alginato de calcio para el tratamiento de aguas residuales urbanas, y lograron elevados valores de remoción de nitrógeno (alrededor del 94 %). Sin embargo, Mujtaba, Rizwan y Lee (2017) reportaron una baja reducción de formas amoniacales del N (13 %) en aguas residuales mediante el uso de *Pseudomonas putida* en condiciones aeróbicas. Esto nos indicaría que, las condiciones experimentales de aerobiosis o anaerobiosis (y

posiblemente la concentración de oxígeno disuelto en el medio) tendrían un efecto considerable en la remoción de N en sistemas biológicos de tratamiento de aguas.

En cuanto al efecto de la cantidad de esferas de alginato de calcio para la remoción de N total, se observó una tendencia creciente de remoción de N total a las 72 h en función a la cantidad de esferas agregadas en cada tratamiento: T1 (20 g de esferas de alginato de calcio con *P. putida* inmovilizada) tuvo un 41,01 % de remoción de N total, T2 (40 g de esferas) con 57,87 % y T3 (60 g de esferas) con 88,72 % (el mejor tratamiento a las 72 h). Sin embargo, se evidenció que T4, que contenía 80 g de esferas de alginato de calcio con *P. putida* inmovilizada (la mayor cantidad de esferas), tuvo un menor valor de remoción de N total (22,71 %). Este resultado podría deberse a que como el biofiltro en T4 contenía una mayor densidad celular que los otros tratamientos, hubo una limitación del crecimiento de las colonias bacterianas por un agotamiento de C disuelto en el medio (Stanbury et al., 2017) o que se haya excedido la densidad celular máxima para el biorreactor (biofiltro) (Chang, 2011).

El tratamiento control, en el que se agregó agua destilada con 80 g de esferas de alginato de calcio con *P. putida* inmovilizada, reveló la presencia de N total desde las 12 h hasta las 72 h, con un valor mínimo de $1,05 \pm 0,01$ mg/L (12h) y un valor máximo de $1,80 \pm 0,02$ mg/L (24h). Debido a que el medio no contenía ningún macro ni micronutriente (como el nitrógeno) para sostener el crecimiento de la población bacteriana, ocurren procesos de catabolismo del nitrógeno: (1) amonificación y remineralización, en el que las proteínas y los péptidos, presentes en *P. putida*, se degradan a aminoácidos por la actividad de proteinasas y peptidasas (p.ej. las desaminasas catabolizan los aminoácidos y liberan amoníaco o amonio); (2) reducción desasimilatoria de nitrato y desnitrificación, proceso clave en el que las bacterias emplean el nitrato como un aceptor de electrones terminal sustituto en ambientes sin oxígeno y es transformado por una serie de reacciones enzimáticas en dinitrógeno (N₂), en esta vía metabólica destacan los géneros de *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Paracoccus* y *Neisseria*; y (3) nitrificación heterotrófica, que es la producción de NO₃⁻ a partir de sustratos tanto orgánicos como inorgánicos y ocurre tanto en hongos como

bacterias, incluyendo varias especies del género *Pseudomonas* (Jeannotte, 2014). La presencia de NT podría deberse a la degradación de las estructuras de algunas esferas de alginato de calcio, lo cual podría haber dejado expuesto a las células. Por lo tanto, es probable que el catabolismo del nitrógeno de *P. putida* y la posterior difusión de solutos al medio por un gradiente de concentración haya ocasionado un incremento en los valores de N total en el tratamiento control.

Los resultados mostraron que la remoción de fósforo (P) total fue 28.26 % (0.94 ± 0.24 mg/L) en promedio para todos los tratamientos, mientras que los valores más altos de remoción de P total que se registró fueron en el Tratamiento 3 (T3) (60 g de esferas de alginato de calcio con *P. putida* inmovilizada) a las 60 h y 72 h, con un 52,31 % (0.62 ± 0.07 mg/L) y 49,23 % (0.66 ± 0.01 mg/L) de remoción, respectivamente. Adicionalmente, se ha observado que T3 presentó una reducción de P total constante hasta las 60 h (0.62 ± 0.66 mg/L), pero se evidenció un ligero incremento a las 72 h (0.66 ± 0.01 mg/L). Fluctuaciones similares fueron registradas para T1 (1.05 ± 0.05 mg/L a las 60 h 1.10 ± 0.04 mg/L a las 72 h) y T2 (1.19 ± 0.02 mg/L a las 48 h y 1.21 ± 0.00 mg/L a las 60 h). Esto puede deberse a que las colonias bacterianas hayan acumulado compuestos orgánicos al inicio del tratamiento (con el oxígeno disuelto remanente del medio) y posteriormente sea necesaria la degradación de polifosfatos en condiciones aneróbicas, lo que provocaría una pequeña liberación de ortofosfatos al medio (Díaz, García & Gonzales, 2014). Los microorganismos pueden acumular en P en condiciones aeróbicas y anóxicas bajo la forma de polifosfatos, que pueden ser liberados en condiciones anaeróbicas como fuente de energía para asegurar la supervivencia cuando otros grupos bacterianos aeróbicos pierden actividad (Pokhrel Milke, Bello-Mendoza, Buitrón & Thiele, 2018). El (T4) a diferencia de los otros tratamientos mostro una remoción constante en todas las horas evaluadas. La remoción de fósforo en microorganismos como *Pseudomonas*, se produce principalmente por la acumulación de este elemento como reserva energética y en algunas situaciones se acumula más allá de los requisitos normales para procesos metabólicos (Kim, Jordan, & McDonald, 1998).

Paul y Sinha (2015) evaluaron la eficiencia de remoción de fosfatos a partir de aguas residuales sintéticas con *Pseudomonas sp.* JPSB12, *Enterobacter sp.* TPSB20, *Flavobacterium sp.* TPSB23 y un consorcio bacteriano mixto compuesto por las tres especies mencionadas y obtuvieron una remoción de fosfatos en 59.10 % con *Pseudomonas sp.* JPSB12 y 77.20 % con el consorcio microbiano cuando se empleó glucosa como fuente de carbono. Este estudio muestra la importancia del uso de fuentes de C de rápida asimilación, como la glucosa, para acelerar el proceso de remoción de fosfatos en aguas, así como la interacción positiva entre especies presentes en consorcios microbianos.

La remoción simultánea de nutrientes (como N y P) por la acción de *P. putida* ATCC 49128 inmovilizada en esferas de alginato de calcio en un biofiltro continuo es un proceso factible, tal como se evidenció en la presente investigación. El tratamiento 3 (T3) registró la mayor remoción para N total y P total a los 72 h. Los procesos de remoción pueden darse en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Esta investigación se realizó bajo condiciones anaeróbicas, en la que la liberación de P genera la acumulación intracelular de polifosfato en forma de polihidroxialcanoatos (PHA).

El análisis inicial de las muestras de agua superficial del humedal de Santa Rosa mostró que la concentración de N y P totales fue de 7,12 mg/L y 1,30 mg/L, respectivamente. En ésta investigación, luego de 72 horas de biofiltración, el tratamiento 3 (T3) fue el más óptimo, registrando el valor de 0,8 mg/L para NT y 0,66 para PT. Sin embargo, estos valores superaron los valores establecidos por el Estándar de Calidad Ambiental (ECA) para agua, Categoría 4: conservación del medio acuático, sub categoría E1: lagunas y lagos (definidos como “cuerpos naturales de agua lénticos, que no presentan corriente continua, incluyendo humedales”), con 0,035 mg/L para P total y 0,315 mg/L para N total (Decreto supremo aprueban estándar de calidad ambiental (ECA) para agua y establecen disposición complementaria N° 004, 2017).

Durante toda la investigación, el valor de pH experimentó variaciones en todos los tratamientos, durante las diferentes horas evaluadas, siendo su valor mínimo de 7,74 (T3 a las 36 h) y el máximo de 8,38 (T2 a las 72 h de evaluación). En el control, el pH que tuvo un valor mínimo de 7,05 a las 12 h y un máximo de 8,11 a las 72 h. Esta variación de pH puede deberse a la actividad desnitrificadora de la bacteria sobre el agua residual, que asimila el metano como fuente energética liberando CO₂ al medio en sistemas anaeróbicos (Modin, Fukushi y Yamamoto, 2007). Debe resaltarse que se evidenció un precipitado en los tratamientos durante la evaluación, lo que puede atribuirse a la precipitación principalmente de P a pH cercanos o por encima de 8,0 (Wang, Pan, Min, Peng, & Wang, 2007).

En esta investigación, la remoción más notable de P total (53,8%) y N total (88,76%) en el T3 fue lograda a valores de pH de 8,14 y 8,15, respectivamente. Esta remoción en medios alcalinos ha sido reportada en otros estudios, en donde las fases anaerobias del experimento tienden a incrementar el pH y hacerlo alcalino (Venegas, 2015).

Existen algunos grupos bacterianos que muestran diferencias en la remoción de compuestos nitrogenados en función al pH del medio. Por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17822 en condiciones anóxicas, presenta un crecimiento óptimo a pH 7,0, esto fue observado al evaluar la cinética de desnitrificación de la bacteria (Almeida, Reis & Carrondo, 1995). Por otro lado, la producción de N₂O y N₂ a partir de nitratos o nitritos en condiciones anóxicas en suspensiones celulares de *Paracoccus denitrificans* DSM 413 se ha demostrado que es afectada por el pH; así por ejemplo a pH 5,5, el nitrato se convirtió en nitrito, este en N₂O y finalmente el N₂O en N₂; mientras que a pH 8,5, el nitrato se convirtió directamente en N₂, y los compuestos intermediarios se acumulan solo en bajas concentraciones en estado estacionario (Thomsen, Geest & Cox, 1994). Por lo tanto, la cinética de desnitrificación es afectada por el pH del medio, la especie (y cepa) seleccionada para realizar ese proceso metabólico y los sustratos adicionados al medio (Almeida et al., 1995; Thomsen et al., 1994).

En la presente investigación, respecto a la relación entre los nutrientes (N total y P total) y el pH, hubo una relación positiva (pero estadísticamente no significativa, $p=0,06$) entre P total y pH, en tanto que existió una relación negativa (pero estadísticamente no significativa, $p=0,385$) entre N total y pH. Huang, Bennett, Teasdale, Kankanamge y Welsh (2017) indicaron que dentro del rango de pH de 3.5-8.5 (rango que representa a la gran mayoría de cuerpos de agua dulce), no existe interferencia para la medición de compuestos nitrogenados (como $\text{NH}_4\text{-N}$ y $\text{NO}_3\text{-N}$) y fosfatados ($\text{PO}_4\text{-P}$) en gradientes difusivos en películas delgadas.

En cuanto a la relación entre los nutrientes y la conductividad, hubo una relación positiva y estadísticamente significativa ($p=0,004$) entre P total y la conductividad, mientras que existió una relación negativa (pero estadísticamente no significativa, $p=0,157$) entre NT y la conductividad. Huang et al. (2017) indican que valores de conductividad $< 400 \mu\text{S cm}^{-1}$ no afectan las mediciones de $\text{NO}_3\text{-N}$ y $\text{PO}_4\text{-P}$; sin embargo, valores $> 400 \mu\text{S cm}^{-1}$ limita las mediciones de $\text{NH}_4\text{-N}$ ya que la competencia iónica ejerce un efecto considerable sobre ese compuesto nitrogenado, pero que tiene un efecto menor en $\text{NO}_3\text{-N}$ y un efecto no significativo sobre $\text{PO}_4\text{-P}$.

Finalmente, la temperatura no fue un factor determinante en este estudio, ya que los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($20\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) y por un corto período de evaluación (0-72 h); además, considerando que la bacteria es mesofila puede tolerar el rango de temperatura de 15 a 35 $^\circ\text{C}$ (Jiang, Huang, Cai, Rong y Chen, 2007).

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

1. En la presente investigación, el agua procedente del Humedal de Santa Rosa usado en los tratamientos se caracterizó por tener altos valores de NT (7,12 mg/L) y PT (1,3 mg/L). Estos resultados valores superaron los valores establecidos por el Estándar de Calidad Ambiental (ECA) para agua, categoría 4: conservación del medio acuático, sub categoría E1: lagunas y lagos.
2. Se logró inmovilizar a la *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en esperas de alginato con una población constante de $6,3 \times 10^8$ UFC/mL, manteniéndose viable durante todo el experimento para la remoción de NT y PT.
3. En el presente estudio se demuestra que, a nivel de laboratorio, es posible la remoción biológica de nitrógeno total y fósforo total por la acción de la bacteria *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizada en perlas de alginato de calcio. El porcentaje de remoción el nitrógeno total en los cuatro tratamientos a las 72 h varió entre $22,71 \pm 0,08$ % (T4) y $88,72 \pm 1,933$ % (T3); en tanto que los porcentajes de remoción de fósforo total en todos los tratamientos, en el mismo periodo de tiempo, varió entre $7,18 \pm 0,44$ % (T2) y $49,23 \pm 0,77$ % (T3).
4. En la presente investigación el mejor tratamiento obtenido para la remoción de NT y PT fue el tratamiento (T3), con valores de 88,72 % y 49,23 % respectivamente a las 72 horas de evaluación.

CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES

1. Se recomienda evaluar otros parámetros de calidad de aguas del Humedal Santa Rosa para poder diseñar un mejor tratamiento de sus aguas y así conservar este ambiente acuático. Por ejemplo, evaluar variables físico-químicos como nitratos (NO_3^-), demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5), sólidos suspendidos totales (SST), e inorgánicos, como arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb).
2. Se sugiere evaluar la resistencia física de las perlas de alginato de calcio sometidas a condiciones similares a este experimento para ampliar el período de remoción de parámetros físico-químicos y mejorar así la eficiencia del biofiltro.
3. Se recomienda la inmovilización de otras cepas (nativas o introducidas) de *Pseudomonas putida*, así como otras especies del género *Pseudomonas*, para poder comparar su desempeño en la remoción de contaminantes en cuerpos de aguas lénticos o lóticos,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Halim, S., Shehata, A. & El-Shahat, M. (2003). Removal of lead ions from industrial waste water by different types of nature materials. *Waste Research*, 37, 1678-1683.
- Almeida, J. S., Reis, M. A. M. & Carrondo. M. J. T. (1995). Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Bioengineering*, 46, 476-484.
- Álvarez, C.D. (2007). Evaluación de la diversidad específica de las aves de los Humedales de Ventanilla, Callao, Perú. (Tesis de grado) Universidad Ricardo Palma.
- Aponte, H. & Ramírez, D. (2011). Humedales de la costa central del Perú: Estructura y amenazas de sus comunidades vegetales. *Ecología Aplicada*, 10(1), 31-39.
- Aquiahuatl, M. & Perez, C. (2004). Manual de prácticas del laboratorio de Microbiología general. Recuperado de http://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/diversos/AQUIAHUATL_RAMOS_MARIA_DE_LOS_ANGELES_Manual_de_practicas_de.pdf
- Aquiahuatl, M. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio. Microbiología General*. (1ra. Ed). México. Universidad Autónoma Metropolitana. Recuperado de http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/MMICROBIO_GENERAL.pdf
- Arcos, M., Ávila, S., Estupiñan, S. & Gomez, L. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. División de investigaciones. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia.
- Blanco, D. & Carbonell, M. (2001). *El censo neotropical de aves acuáticas. Los primeros 10 años: 1990-1999*. Wetlands International, Buenos Aires, Argentina y Ducks Unlimited, Inc. Memphis, USA. 190 p.
- Botello, A., Ponce, G. & Villanueva, S. (1999). Procesos de contaminación de humedales en el sureste de México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. México. 49, 57 – 73.
- Carpenter, S., Caraco, D., Correll, R., Howarth, A., Sharpley, N. & Smith, V. (1998). Nonpoint pollution of Surface waters with phosphorus and nitrógeno. *Ecological Applications* 8, 559-568.
- Chang, H. N. (2011). Multistage continuous high cell density culture. En Moo-Young, M. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (pp. 537-577). (2nd Edition). Elsevier B.V. 5320 pp.

- Chen, P., Li, J., Li, Q. X., Wang, Y., Li, S., Ren, T. & Wang, L. (2012). Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. *Bioresource Technology*, 116, 266-270.
- Chitiva, L. & Dussán, J. (2003). Evaluación de matrices para la inmovilización de *Pseudomonas* spp. en biorremediación de fenol. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 5-10.
- Chung, Y.C., Huang, C. & Tseng, C.P. (1996). Biodegradation of hydrogen sulfide by a laboratory-scale immobilized *Pseudomonas putida* Ch11 biofilter. *Biotechnology Progress*, 12, 773-778.
- Claros, J.A. (2012). Estudio del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito para el tratamiento biológico de corrientes de agua residual con alta carga de nitrógeno amoniacal. Universitat Politècnica de València, Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/17653/tesisUPV3951.pdf?sequence=1>
- Cornejo, D. (2015). *Determinación de la eficiencia de remoción de la DBO en agua residual doméstica mediante la utilización de un biofiltro de piedra pómez*. (Tesis de licenciatura), Universidad Nacional de Trujillo. Recuperado de http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3261/CornejoSoldevilla_D.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Daane, L., Harjono, I., Zylstra, G. & Haggblom, M. (2001). Isolation and characterization of polycyclic Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the Rhizosphere of salt Marsh plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2683-2691.
- Díaz, M., García, A. & Gonzales, M. (2014). Aprendiendo metabolismo microbiano en una EDAR (estación depuradora de aguas residuales). *Microbiología Ambiental*, 7(1), 15-32.
- Decreto Supremo Aprueban Estándar de Calidad Ambiental (ECA) para agua y establecen disposición complementaria N° 004-2017-MINAM. Diario El Peruano, Lima, Perú, 07 de junio 2017. pp. 10-19.
- Franco, L., Delgado, J. & Andrade, G. (2013). Factores de la vulnerabilidad de los humedales altoandinos de Colombia al cambio climático. *Revista colombiana de geografía*, 22(2), 69-85.
- García-Pausas, J., Casals, P., Camarero, L., Huguet, C., Sebastià, M., Thompson, R., & Romanyà, J. (2007). Soil Organic Carbon Storage in Mountain Grasslands of the Pyrenees: Effects of Climate and Topography. *Biogeochemistry*, 82(3), 279-289. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/20456458>
- Garzón, C. & Barragán B., (2008). Inmovilización microbiana: técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista Sistemas Ambientales*, 2, 23-34.

- González, M. & Saldarriaga, J. (2008). Remoción biológica de materia orgánica, nitrógeno y fósforo en un sistema tipo anaerobio-anóxico-aerobio. *Revista EIA*, 10, 45-53.
- Hernández, S. (2011). *Inmovilización de microorganismos en esferas de alginato como protección contra condiciones adversas en un tratamiento de agua residual*. (Tesis de Maestría). Centro de investigaciones del Noroeste. S.C. México. Recuperado de https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/223/1/hernandez_s.pdf
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, N., Staley, J. & Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th Ed.). Baltimore: William & Wilkins Editors. pp. 448-455.
- Huang, J., Bennett, W. W., Teasdale, P. R., Kankanamge, N. & Welsh, D.T. (2017). A modified DGT technique for the simultaneous measurement of dissolved inorganic nitrogen and phosphorus in freshwaters. *Analytica Chimica Acta*, 988, 17-26.
- Jeannotte, R. (2014). Nitrogen metabolism. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 544 – 560 Volume 2. Elsevier Ltd.
- Jiang, D., Huang, Q., Cai, P., Rong, X. & Chen, W. (2007). Adsorption of *Pseudomonas putida* on clay minerals and iron oxide. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 54 (2), 217-221.
- Jiménez, E. & Villegas, A. M. (2005). Diseño de un sistema de biofiltración para la remoción de estireno. *Revista EIA*, 3, 9-20.
- Kim, K. Y., Jordan, D. & McDonald, G.A. (1998). *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8-9), 995-1003.
- Kim, J. K., Park, K. J., Cho, K. S., Nam, S. W., Park, T. J. & Bajpai, R. (2005). Aerobic nitrification–denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*, 96(17), 1897-1906.
- Kovárová-Kovar, K. & Egli, T. (1998). Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 646–666
- Kronvang, B., Jensen, J. P., Hoffmann, C. C. & Boers, P. (2008). Chapter 9. Nitrogen Transport and Fate in European Streams, Rivers, Lakes, and Wetlands. J.L. Hatfield and R.F. Follett (Eds). En: *Nitrogen in the Environment: Sources, Problems, and Management*. 241-270. Elsevier Inc. Second Edition. 720.
- López, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S. y García, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82-90.

- Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2005). *Brock: Biology of Microorganisms*. Upper Saddle River: Pearson/Prentice Hall, 11.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. & Clark, D. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos* (12 th ed.). Pearson, España.
- Matsuba, D., Takazaki, H., Sato, Y., Takahashi, R., Tokuyama, T. & Wakabayashi, K. (2003). Susceptibility of ammonia-oxidizing bacteria to nitrification inhibitors. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 58(3-4), 282-287.
- Mayta, M. & Vela, D. (2015). *Tratamiento biológico del cromo (VI) con pseudomonas putida en un biorreactor airlift de tubos concéntricos*. (Tesis de grado) Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Megonigal, J. P. & Neubauer, S. C. (2019). *Chapter 19 - Biogeochemistry of Tidal Freshwater Wetlands*. En: *Coastal Wetlands: An Integrated Ecosystem Approach*. Gerardo M.E. Perillo, Eric Wolanski, Donald R. Cahoon, Charles S. Hopkins (Eds.). Elsevier B.V, Second Edition. 1124 pp.
- Modin, O., Fukushi, K. & Yamamoto, K. (2007). Denitrification with methane as external carbon source. *Water Research*, 41, 2726-2738.
- Mujtaba, G., Rizwan, M. & Lee, K. (2017). Removal of nutrients and COD from wastewater using symbiotic co-culture of bacterium *Pseudomonas putida* and immobilized microalga *Chorella vulgaris*. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 49, 145-151.
- Muñoz, A. (2008). *Caracterización y tratamiento de aguas residuales*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Estado de Hidalgo, México.
- Obeso, J. I. (2017). *Síntesis de polihidroxialcanoatos en Pseudomonas putida: estudios bioquímicos, genéticos y ultraestructurales*. (Tesis de doctorado). Universidad de León, España. Recuperado de <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/6940/Tesis%20Jos%C3%A9%20Ignacio%20Obeso%20Rodr%C3%ADguez.pdf?sequence=1>
- Orozco, C., Pérez, A., Gonzales, M., Rodríguez, F. & Alfayate, J. (2005). *Contaminación Ambiental. Una visión desde la Química*. Tercera edición, Thomson Editoriales Spain Paraninfo, S.A., España.
- Palleroni, N. J. (2005). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. En: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Volume 2: The Proteobacteria Part B, 322-379.
- Paul, S. & Sinha, S. (2015). Biological removal of phosphate using phosphate solubilizing bacterial consortium from synthetic wastewater: a laboratory scale. *Environment Asia*, 8(1), 1-8.

- Pokhrel, S. P.; Milke, M. W.; Bello-Mendoza, R.; Buitrón, G. & Thiele, J. (2018). Use of solid phosphorus fractionation data to evaluate phosphorus release from waste activated sludge. *Waste Management*, 76, 90-97.
- Prescott, L., Harley, J. & Klein, D. (1999). *Microbiología*. Mc Graw-Hill Interamericana de Madrid, España.
- Priyanka, P., Kinsella, G., Henahan, G. T. & Ryan, B. J. (2018). Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*. *Protein Expression and Purification*, 153, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.08.007>
- Ramsar. (1971). *Manual de la convención de Ramsar. Guía sobre los humedales*. 4ta edición. Secretaria de la convención de Ramsar, Irán.
- Ramsar. (2006). *Manuales Ramsar para el uso racional de los humedales*. Disponible en: <http://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/pdf/lib/hbk4-01sp.pdf>.
- Repetto, M. & Sanz, P. (1995). *Glosario de términos toxicológicos*. Asociación Española de Toxicología, España.
- Revelles, O., Espinosa, M., Fuhrer, T., Sauer, U. & Ramos, L. (2005). Multiple and interconnected pathways for L-lysine catabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Bacteriology*, 187, 7500–7510.
- Roldán, G. & Ramírez, J. (2008). *Fundamentos de Limnología Neotropical*. (2da ed.). Editorial Universidad de Antioquia. Colombia.
- Sánchez, T. H. (2014). *Cultivo de Spirulina platensis (Gomont) Geitler en Fast Biol T20 para la obtención de biomasa como fuente alternativa de proteína*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Senhadji, N. K., Ruiz, O. M. & Rodriguez, M. J. (2017). Estado ecológico de algunos humedales colombianos en los últimos 15 años: una evaluación prospectiva. *Colombia forestal*, 20 (2), 181-191.
- Slabbinck, B., De Baets, B., Dawyndt, P. & De Vos, P. (2010). Análisis de *Pseudomonas* fitopatógenas usando métodos inteligentes de aprendizaje: un enfoque general sobre taxonomía y análisis de ácidos grasos dentro del género *Pseudomonas*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(1), 1-16.
- Smith, V. H., Tilman, G. D. & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100, 179–196.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A. & Hall, S.J. (2017), Chapter 2- Microbial growth kinetics. 21-74. Peter F. Stanbury, Allan Whitaker, Stephen J. En: *Principles of Fermentation Technology*. 21-74. Hall Elsevier Ltd., Third Edition.

- Thomsen, J. K., Geest, T. & Cox, R. P. (1994). Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Applied Environmental Microbiology*, 60(2), 536-541
- Venegas, B. (2015). *Biological nutrient removal from a high-strength ammonium wastewater using a sequencing batch reactor*. (Tesis de doctorado). Escuela Técnica superior de ingenieros de caminos, canales y puertos de la Universidad de Cantabria. Recuperado de <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/8451>
- Vitousek, P. M., Aber, J., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., Schlesinger, W. H. & Tilman, G. D. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. *Ecological Applications*, 7, 737-750.
- Wan, W., He, D. & Xue, Z. (2017). Removal of nitrogen and phosphorus by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a denitrifying phosphorus-accumulating bacterium *Enterobacter cloacae* HW15. *Ecological Engineering*, 99, 199-208.
- Wang, Y., Pan, M., Min, Y., Peng, Y. & Wang, S. (2007). Characteristics of anoxic phosphorus removal in sequence batch reactor. *Journal of Environmental Sciences*, 19(7), 776-782.
- WTW (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten). (2016). pHotoFlex® STD - Práctica y normativas de análisis, Prog. v 2.06. Recuperado de https://static.wtw.com/fileadmin/upload/Service/Downloads/Bedienungsanleitungen/Photometrie_BSB_Truebung/ba75509s22_photoflex_Tests_WTW.pdf
- Yao, S., Ni, J., Ma, T. & Li C. (2013). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. *Bioresource Technology*, 139, 80-86
- Zhang, J., Wu, P., Hao, B. & Yu, Z. (2011). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium. *Pseudomonas stutzeri* YZN-001.2011. *Bioresource Technology*, 102(2), 9866–9869.
- Zaballa, I., Zanon, M., Cuello, C., Gori, J., Vaccaro, R. & Ribaudó, C. (2016). Remoción biológica de nitrógeno y fósforo en aguas residuales por parte de microalgas y bacterias co-inmovilizadas. 3er Encuentro de Investigación en Formación en Recursos Hídricos.
- Zenteno-Rivera, P. E. (2010). *Caracterización Geoquímica del humedal de Batuco: Distribución de metales en perfiles de sedimentos*. (Tesis de maestría). Escuela de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, Chile.

TERMINOLOGÍA

- **Aguas residuales:** Las aguas residuales o aguas grises son aguas generadas por los usos domésticos, urbanos, comerciales, de servicios agrícolas, etc. estas aguas de tipo residual son de mucha importancia, porque puede ser de mucha utilidad en el campo del regadío ecológico. Las aguas residuales generalmente se descomponen más rápido que las aguas negras, denominando a estas que presenta contaminación fecal y tiene mucho menos de nitrógeno y fósforo. Sin embargo, las aguas residuales contienen algún porcentaje de aguas negras, incluyendo algunos patógenos de varias clases (Muñoz, 2008).
- **Absorción (biológica).** Proceso de entrada o transporte, activo o pasivo, de una sustancia al interior de un organismo; puede tener lugar a través de diferentes vías. Adsorción, enriquecimiento o concentración de uno o más componentes sobre la superficie de una interfase (Repetto y Sanz, 1995).
- **Bacteria:** Organismo microscópico, sin núcleo, unicelular, procariota, que se multiplica por simple división (Prescott et al., 1999).
- **Biogeoquímica:** La biogeoquímica es la disciplina que estudia los procesos y reacciones químicas, físicas, geológicas y biológicas que gobiernan la composición del medio ambiente natural (incluyendo la biósfera, la criósfera, la hidrósfera, la pedósfera, la atmósfera y la litósfera). En particular, la biogeoquímica es el estudio de los ciclos de los elementos químicos, tales como el nitrógeno y el carbono, y su interacción e incorporación en los seres vivos. Su foco es el estudio de los ciclos químicos que tienen impacto en procesos biológicos (García-Pausas et al., 2007).
- **Cinética de crecimiento microbiano:** Es la relación entre la tasa de crecimiento específica de una población microbiana y la concentración de sustrato. Representa una herramienta indispensable en todos los campos de la microbiología, ya sea fisiología, genética, ecología o biotecnología (Kovárová-Kovar y Egli, 1998).

- **Degradación:** La degradación en sí se refiere a "una reducción de grado o a un rango menor", o a "cambios en la homeóstasis de un sistema", de tal forma que hay una reducción en su productividad (García-Pausas et al., 2007).

- **Organismos Indicadores de Contaminación:** Según Arcos, Ávila, Estupiñan y Gomez (2005), los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos, concentración y reacción frente a factores ambientales, pero son más fáciles, rápidos y económicos de identificar. Una vez demostrada la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador. Un microorganismo indicador de contaminación fecal debe reunir lo siguiente:
 - Ser un constituyente normal de la flora intestinal de individuos sanos.
 - Estar presente, de forma exclusiva, en las heces de animales homeotérmicos.
 - Estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están.
 - Presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación.
 - Debe ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotérmicos.
 - Su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de las bacterias patógenas, su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal.
 - Debe ser fácil de aislar y cuantificar.
 - No debe ser patógeno.

APÉNDICES

Apéndice 1. Registro de la cantidad de colonias (UFC) de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 obtenida en las diferentes horas evaluadas

Tiempo (h)	Recuento de colonias ($\times 10^7$ UFC/mL)
7,5	18
8,0	27
8,5	29
9,0	30
10,0	31
11,0	33
12,0	35
13,0	36
14,0	37
15,0	42
16,0	43
17,0	47
18,0	52
19,0	55
20,0	57
21,0	60
22,0	63
23,0	58
24,0	59

Apéndice 2. Prueba de Tukey de la variación de la concentración de nitrógeno total a las diferentes horas

NITRÓGENO

HSD Tukey^{a,b}

H	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
72 h	12	2,9096						
60 h	12		3,1942					
48 h	12			3,9475				
36 h	12				4,4100			
24 h	12					4,9525		
12 h	12						5,6642	
0 h	12							7,1167
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 0,033.

b. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.

Apéndice 3. Prueba de Tukey de la variación de la concentración de fósforo total a las diferentes horas

FÓSFORO

HSD Tukey^{a,b}

H	N	Subconjunto		
		1	2	3
60 h	12	0,9625		
72 h	12	0,9633		
48 h	12	1,0058	1,0058	
36 h	12		1,0521	1,0521
24 h	12			1,0600
12 h	12			1,0992
Sig.		0,122	0,083	0,074

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 0,002.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.

b. Alfa = 0,05.

Apéndice 4. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para agua (Decreto supremo aprueban 004-2017- MINAM): Parámetros físico-químicos para la categoría 4

Categoría 4: Conservación del ambiente acuático

Parámetros	Unidad de medida	E1: Lagunas y lagos	E2: Ríos		E3: Ecosistemas costeros y marinos	
			Costa y sierra	Selva	Estuarios	Marinos
FÍSICOS- QUÍMICOS						
Aceites y Grasas (MEH)	mg/L	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Cianuro Libre	mg/L	0,0052	0,0052	0,0052	0,001	0,001
Color (b)	Color verdadero Escala Pt/Co	20 (a)	20 (a)	20 (a)	**	**
Clorofila A	mg/L	0,008	**	**	**	**
Conductividad	(μ S/cm)	1 000	1 000	1 000	**	**
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	mg/L	5	10	10	15	10
Fenoles	mg/L	2,56	2,56	2,56	5,8	5,8
Fósforo total	mg/L	0,035	0,05	0,05	0,124	0,062
Nitratos (NO ₃ ⁻) (c)	mg/L	13	13	13	200	200
Amoniaco Total (NH ₃)	mg/L	(1)	(1)	(1)	(2)	(2)
Nitrógeno Total	mg/L	0,315	**	**	**	**
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	≥ 5	≥ 5	≥ 5	≥ 4	≥ 4
Potencial de Hidrógeno (pH)	Unidad de pH	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,8 – 8,5	6,8 – 8,5
Sólidos Suspendedos Totales	mg/L	≤ 25	≤ 100	≤ 400	≤ 100	≤ 30
Sulfuros	mg/L	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Temperatura	°C	Δ 3	Δ 3	Δ 3	Δ 2	Δ 2

Fuente: Decreto supremo aprueban estándar de calidad ambiental (ECA) para agua y establecen disposición complementaria N° 004, 2017.

Apéndice 5. Registro fotográfico de la investigación

Fotografía 5.1. Lugar de la toma de muestra en el humedal de Santa Rosa



Fotografía 5.2. Preparación de las esferas de alginato de calcio



Fotografía 5.3. Observación de *Pseudomona putida* ATCC 49128 después de su coloración Gram

