

UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL



TESIS DE INVESTIGACIÓN

**“REMOCIÓN DE PLOMO Y CADMIO PRESENTE EN EL
AFLUENTE DEL RÍO PATIVILCA, BARRANCA-LIMA POR
CÉLULAS INMOVILIZADAS DE *Pseudomonas putida* ATCC
49128”**

EJECUTOR:

Bach. KENJI TAKAHASHI SÁNCHEZ

ASESORA:

Mg. HEIDI ISABEL SÁNCHEZ TORRES

HUACHO – PERÚ

2018

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA N° 016.- 2018/UCSS/FIA

Siendo las 02:00 pm, del día 03 de diciembre de 2018, en el Aula 05 de la Filial Huaura: Végueta - Universidad Católica Sedes Sapientiae, el Jurado de Tesis, integrado por:

- | | |
|--|-----------------|
| 1. Dr. José Luis Rodríguez Núñez | Presidente |
| 2. Mg. Sc. José Miguel Montemayor Mantilla | Primer Miembro |
| 3. Ing. Isabel Romero Ramírez | Segundo Miembro |
| 4. Mg. Sc. Heidi Isabel Sánchez Torres | Asesora |

Se reunieron para la sustentación de la tesis titulada: "REMOCIÓN DE PLOMO Y CADMIO PRESENTE EN EL AFLUENTE DEL RÍO PATIVILCA, BARRANCA-LIMA POR CÉLULAS INMOVILIZADAS DE *Pseudomonas putida* ATCC 49128", que presenta el bachiller en Ciencias Ambientales, el Sr. Kenji Takahashi Sánchez 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 conferirle el TÍTULO de INGENIERO AMBIENTAL.

Firmado en Huaura, 03 de diciembre de 2018.


Dr. José Luis Rodríguez Núñez
PRESIDENTE


Mg. Sc. José Miguel Montemayor Mantilla
1° MIEMBRO


Ing. Isabel Romero Ramírez
2° MIEMBRO


Mg. Sc. Heidi Isabel Sánchez Torres
ASESORA

DEDICATORIA

El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. El no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir y señalar el camino.

(Nikola Tesla, 1856-1943)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padre José Antonio Takahashi Laurente y a mi madre Jeannette Sánchez Botia, por el apoyo incondicional que siempre me otorgan para cumplir todos mis logros importantes en mi vida. También agradezco a mi hermana sé que ella me apoyara siempre que necesite su ayuda, de igual forma a mi amigo Hunter que siempre lo refleja con su alegría.

Sinceramente quiero agradecer a mi asesora Heidi Isabel Sánchez Torres y al coasesor Armando Chiclla Salazar por enseñarme y guiarme en todo el proceso de la tesis, ya que esto no sería posible sin ellos.

Agradezco a Lucía Mabel Salas Zafra por apoyarme siempre en los años que estudiamos juntos en la universidad. A Paola Ludeña, hemos pasado una odisea realizando nuestras tesis, pero hemos podido superar todos los obstáculos y problemas que nos han puesto en medio, en verdad muchas gracias por apoyarme en el laboratorio. A Georgina Cristina Dextre Rojas (La animalista de corazón), Brenda Coa Pozo (Brendita), Bertha Muñoz Flores (Berthiña) y Jeampiere Raúl Márquez Ignacio (El terrible) gracias por apoyarme en mi tesis cuando más lo necesitaba. También agradezco a mis amigos Karol Paola Sánchez, Álvaro Gonzáles Bisso, Juan Tante Valderrama, Jhony Anaya Arce y Ana Lucia Torres.

Atte. Kenji Takahashi Sánchez

ケンジ・高橋・サンチェス

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
CARÁTULA	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE APÉNDICES	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	xiv
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	1
1.1. ANTECEDENTES	1
1.2. BASES TEÓRICAS	7
1.2.1. Cuenca	7
1.2.1.1. Cuenca Pativilca	10
1.2.2. Eutrofización y nutrientes	11
1.2.3. Calidad de agua	11
1.2.4. Metales pesados	12
1.2.4.1. Plomo	14
1.2.4.2. Cadmio	18
1.2.5. Bacterias	22
1.2.6. <i>Pseudomonas</i>	25
1.2.6.1. <i>Pseudomonas putida</i>	28
1.2.7. Resistencia y tolerancia de las bacterias a los metales pesados	30
1.2.8. Biorremediación	31
1.2.9. Inmovilización de células	33
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	36
2.1.1. Lugar y fecha	36

2.1.2.	Descripción del experimento	36
2.1.2.1.	Activación de la cepa <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128	37
2.1.2.2.	Adaptación y selección de colonias de <i>pseudomonas putida</i> ATCC 49128 resistentes a altas concentraciones de plomo y cadmio.	38
2.1.2.3.	Toma de muestra	39
2.1.2.4.	Preparación de las muestras de agua extraídas del afluente del río Pativilca	40
2.1.2.5.	Caracterización físico-química de las muestras de agua extraído del afluente del río Pativilca-Lima	41
2.1.2.6.	Inmovilización de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 con alginato de calcio	41
2.1.2.7.	Evaluación de la capacidad de remoción de plomo y cadmio por la cepa <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 aplicada en las muestras de agua extraído del afluente del río Pativilca	42
2.1.2.8.	Cinética de crecimiento	43
2.1.2.9.	Evaluación de parámetros físico-químico durante la aplicación de las perlas de alginato de calcio con células de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 a las muestras de agua extraídas del afluente del río Pativilca	44
2.1.3.	Tratamientos	45
2.1.4.	Unidades experimentales	46
2.1.5.	Diseño estadístico del experimento	46
2.1.6.	Análisis estadístico	46
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		48
3.1.	RESULTADOS	48
3.1.1.	Características físico-químicos iniciales de las muestras de agua extraídas del afluente del río Pativilca	48
3.1.2.	Crecimiento bacteriano de la cepa <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128	49
3.1.3.	Adaptación y selección de colonias de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 resistentes a altas concentraciones de plomo y cadmio	50
3.1.3.1.	Adaptación en nitrato de plomo	50
3.1.3.2.	Adaptación en sulfato de cadmio	51
3.1.4.	Selección de las células de la cepa <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 adaptadas a los metales de cadmio y plomo	52
3.1.5.	Variación de la concentración de nitrógeno total en las muestras de agua extraídas del afluente del río Pativilca	53

3.1.6.	Variación de la concentración de fósforo total en las muestras de agua del extraídas del afluente del río Pativilca	55
3.1.7.	Variación de pH en las muestras de agua extraídas del afluente del río Pativilca	58
3.1.8.	Variación de conductividad en las muestras de agua extraída del afluente del río Pativilca	60
3.1.9.	Variación de la concentración de cadmio en las muestras extraídas del afluente del río Pativilca	62
3.1.10.	Evaluación de remoción del cadmio	64
3.1.11.	Variación de la concentración de plomo en las muestras de agua extraída del afluente del río Pativilca	66
3.1.12.	Evaluación de remoción en plomo	68
3.1.13.	Características físico-químicos finales de las muestras de agua extraída del afluente después del tratamiento	70
3.2.	DISCUSIÓN	71
	CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	77
	CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES	78
	REFERENCIAS	79
	TERMINOLOGÍA	88
	APÉNDICES	92

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. <i>Tabla de mensuración</i>	45
Tabla 2. <i>Tiempo y tratamiento considerados en la investigación (T: tiempo; Tr1: tratamiento 1; AP: agua del afluente del río Pativilca conteniendo Pb o Cd)</i>	46
Tabla 3. <i>Promedio de los resultados de los análisis físico-químico de la muestra de agua del río Pativilca (promedio \pm desviación estándar)</i>	48
Tabla 4. <i>Parámetros cinéticos de crecimiento bacteriano</i>	50
Tabla 5. <i>Resultados en la adaptación de la cepa Pseudomonas putida ATCC 49128 en el medio con diferentes concentraciones de nitrato de plomo (Pb (NO₃)₂) (promedio \pm desviación estándar)</i>	51
Tabla 6. <i>Resultados en la adaptación de la cepa Pseudomonas putida ATCC 49128 en el medio con diferentes concentraciones de sulfato de cadmio (Cd(SO₄)) (promedio \pm desviación estándar)</i>	52
Tabla 7. <i>Análisis de variación en el parámetro del nitrógeno total (promedio \pm desviación estándar)</i>	53
Tabla 8. <i>Análisis de variación en el parámetro del fósforo total (promedio \pm desviación estándar)</i>	56
Tabla 9. <i>Análisis de variación en el parámetro del cadmio (promedio \pm desviación estándar)</i>	58
Tabla 10. <i>Análisis de la variación en el parámetro de plomo (promedio \pm desviación estándar)</i>	61
Tabla 11. <i>Análisis de la variación en el parámetro de pH (promedio \pm desviación estándar)</i>	63
Tabla 12. <i>Análisis de variación del parámetro de conductividad (promedio \pm desviación estándar)</i>	64
Tabla 13. <i>Remoción en porcentaje de cadmio (promedio \pm desviación estándar)</i>	66
Tabla 14. <i>Remoción en porcentaje de plomo (promedio \pm desviación estándar)</i>	68
Tabla 15. <i>Promedio de los resultados de los análisis físico-químico de la muestra del Afluente del río Pativilca luego del tratamiento con perlas de alginato de calcio con Pseudomonas putida ATCC 49128 a las 24 horas (promedio \pm desviación estándar)</i>	69

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Transporte y ciclo de la contaminación por plomo	16
<i>Figura 2.</i> Contaminación por cadmio: transporte y ciclo	19
<i>Figura 3.</i> Árbol filogenético del dominio Bacterias	22
<i>Figura 4.</i> Morfología representativa de las células procariotas	23
<i>Figura 5.</i> Diagrama esquemático de paredes celulares. (a) Pared celular grampositiva. (b) Pared celular gramnegativa	24
<i>Figura 6.</i> Estructura general de una célula procariota	24
<i>Figura 7.</i> Mecanismo de interacción de <i>Pseudomonas</i> con los metales pesados	27
<i>Figura 8.</i> Mecanismo de interacción de los microorganismos con los metales	32
<i>Figura 9.</i> Iones polivalentes del calcio inducen asociación entre cadenas adyacentes de ácido algínico	34
<i>Figura 10.</i> (A) Cadenas de alginato de sodio sin entrecruzamiento. (B) cadenas adyacentes de alginato de sodio entrecruzadas con iones calcio (entrecruzamiento de las cadenas poliméricas)	35
<i>Figura 11.</i> Diagrama de flujo del proceso de la activación de la cepa <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128	38
<i>Figura 12.</i> Diagrama de flujo de la adaptación de las <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 en metales	39
<i>Figura 13.</i> Ubicación de la toma de muestra en el río Pativilca	40
<i>Figura 14.</i> Diagrama de flujo de la elaboración de perlas de alginato de calcio con células de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128	42
<i>Figura 15.</i> Curva de crecimiento de la <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128	49
<i>Figura 16.</i> Variación de nitrógeno total y el control	54
<i>Figura 17.</i> Variación de fósforo total y el control	57
<i>Figura 18.</i> Variación de pH y su control	59
<i>Figura 19.</i> Variación de conductividad	61
<i>Figura 20.</i> Variación de cadmio y su control	63
<i>Figura 21.</i> Remoción de cadmio	65
<i>Figura 22.</i> Variación de plomo y su control	67
<i>Figura 23.</i> Remoción de plomo	68

ÍNDICE DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice 1. Descripción de nitrógeno total	92
Apéndice 2. Prueba de homogeneidad de varianzas de nitrógeno total	92
Apéndice 3. Análisis de varianzas (ANOVA) para la concentración de nitrógeno total	92
Apéndice 4. Comparación múltiples de HSD de TUKEY para nitrógeno total	93
Apéndice 5. Prueba HSD de TUKEY para nitrógeno total	94
Apéndice 6. Descriptivos de fósforo total	94
Apéndice 7. Prueba de homogeneidad de varianzas de fósforo total.	94
Apéndice 8. Análisis de varianzas (ANOVA) para la concentración de fósforo total	95
Apéndice 9. Comparación múltiples de HSD de TUKEY para fósforo total	95
Apéndice 10. Prueba HSD de TUKEY para fósforo total	96
Apéndice 11. Descriptivos de pH	96
Apéndice 12. Prueba de homogeneidad de varianzas de pH	96
Apéndice 13. Análisis de varianzas (ANOVA) para pH	97
Apéndice 14. Comparación múltiples de HSD de TUKEY para pH	97
Apéndice 15. Prueba HSD de TUKEY para pH	98
Apéndice 16. Descriptivos de conductividad	98
Apéndice 17. Prueba de homogeneidad de varianzas de conductividad	98
Apéndice 18. Análisis de varianzas (ANOVA) para conductividad	99
Apéndice 19. Comparación múltiples de HSD de TUKEY conductividad	99
Apéndice 20. Prueba HSD de TUKEY para conductividad	100
Apéndice 21. Descriptivos de cadmio	100
Apéndice 22. Prueba de homogeneidad de varianzas de cadmio	100
Apéndice 23. Análisis de varianzas (ANOVA) para la concentración de cadmio	101
Apéndice 24. Comparación múltiples de HSD de TUKEY para cadmio	101
Apéndice 25. Prueba HSD de TUKEY para cadmio	102
Apéndice 26. Descriptivos de plomo	102
Apéndice 27. Prueba de homogeneidad de varianzas de plomo	102
Apéndice 28. Análisis de varianzas (ANOVA) para la concentración de plomo	103
Apéndice 29. Comparación múltiples de HSD de TUKEY para plomo	103

Apéndice 30. Prueba HSD de TUKEY para plomo	104
Apéndice 31. Resultado de monitoreo de Autoridad Local del Agua de Barranca-ANA en 2014	104
Apéndice 32. Mapa de puntos de monitoreo de Autoridad Local del Agua de Barranca-ANA en 2014	105
Apéndice 33. Parámetros físico-químico de la categoría 3 de D.S.004-2017-MINAM (Estándares de Calidad de Agua)	106
Apéndice 34. Parámetros de metales de la categoría 3 de D.S.004-2017-MINAM (Estándares de Calidad de Agua)	107
Apéndice 35. Registro fotográfico de la investigación	108

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo principal la evaluación de la remoción de los metales plomo y cadmio presentes del agua extraído del afluente del río Pativilca, Barranca – Lima, aplicando como tratamiento células de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizadas. La cepa bacteriana se adquirió del American Type Culture Collection, que fue activada con agar King B e incubada durante 24 horas a 35 °C. La cepa bacteriana se sometió a una adaptación previa, para lograr una mejor actividad de remoción, se usaron diferentes concentraciones de plomo y cadmio (desde 0,01 mg/ml hasta 0,1 mg/ml) en caldo tripticasa de soya e incubados por 5 días a 33 °C obteniendo como la mejor adaptación de la bacteria en la concentración 0,01 mg/ml de plomo y cadmio, que reflejó el mayor crecimiento poblacional. El tratamiento consistió en preparar perlas conteniendo 2,0 g de biomasa de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas y mezcladas con 60 ml de alginato de calcio, sometidas a los tiempos de 0, 6, 12, 18 y 24 horas en aguas del río Pativilca. Finalmente se obtuvo una remoción de $71,21 \pm 1,0369$ % en plomo y de $96,88 \pm 0,5103$ % en cadmio. Por lo tanto, las células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizadas y adaptadas logran biorremediar las aguas contaminadas con iones metálicos.

Palabras clave: Remoción, metal pesado, plomo, cadmio, *Pseudomonas putida* ATCC 49128, río Pativilca, inmovilización, tolerancia.

ABSTRACT

The main objective of this investigation was to evaluate the elimination of lead and cadmium metals in the effluent extracted from the Pativilca River, Barranca - Lima, by applying cells of the *Pseudomonas putida* ATCC 49128 strain immobilized as treatment. The bacterial strain was purchased from the American Type Culture Collection, which was activated with agar King B and incubated for 24 hours at 35 ° C. The bacterial strain was subjected to a previous adaptation, to achieve a better elimination action, different concentrations of lead and cadmium were used (from 0.01 mg/ml to 0.1 mg/ml) in triptic soy broth (TSB) and incubated for 5 days at 33 °C, obtaining as the best adaptation of the bacteria in the concentration 0.01 mg / ml of lead and cadmium, which reflected the highest population growth. The treatment consisted in preparing pearls containing 2.0 g of the biomass of *Pseudomonas putida* ATCC 49128, adapted and mixed with 60 ml of calcium alginate, at certain times like 0, 6,12,18 and 24 hours in the water of the Pativilca River. Finally, a 71.21 ± 1.0369 % lead removal of 96.88 ± 0.5103 % in cadmium was obtained. Therefore, the cells *Pseudomonas putida* ATCC 49128 immobilized and adapted accomplished to bioremediate effluents contaminated with metal ions.

Keywords: Removal, heavy metal, lead, cadmium, *Pseudomonas putida* ATCC 49128, Pativilca river, immobilization, tolerance.

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados están considerados como elementos peligrosos y tóxicos para los seres vivos en general, debido a su tendencia a bioacumularse. La toxicidad está causada usualmente por la imposibilidad del organismo afectado para sostener los niveles requeridos de excreción. El proceso se empeora cuando pasa por las distintas cadenas tróficas, donde metales pesados ingresan a los organismos productores y son las principales vías de acceso hacia los consumidores (Navarro, Aguilar y López, 2007). Los metales que presenta importancia toxicológica y ecotoxicológica en ambientes acuáticos figuran: mercurio (Hg), arsénico (As), cromo (Cr), plomo (Pb), cadmio (Cd), níquel (Ni) y zinc (Zn); para la mayoría de los organismos la exposición por encima de una concentración umbral puede ser extremadamente tóxica (Castañé, Topolián, Cordero & Salibián, 2003).

Entre los metales pesados que perjudican mucho a la salud humana son el plomo y cadmio cuya producción mundial fue de 3, 840,000 toneladas y 19,400 toneladas en el año 2008, en que países como China y Australia alcanzaron alrededor del 30 % y 22 % de la producción del plomo respectivamente; en el caso del cadmio, el mayor porcentaje de producción se concentra en los países del Asia. Mientras que en América Latina y el Caribe representó el 15 % del plomo de la producción mundial. El Perú es uno de los países del América latina con mayor producción de plomo con el 9 %, sin embargo, respecto a la producción del cadmio, México es el principal productor con el 20,7 % y el Perú con 4,8 % (Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA], 2010).

Existen lugares en donde la contaminación como consecuencia de la extracción de minerales ocasionan daños que difícilmente pueden recuperarse a tal punto puede ser considerado un impacto irreversibles, como es el caso la localidad de la Oroya, en Perú que ha sido declarados uno de los 5 lugares más contaminados del planeta por el Instituto Blacksmith en el año 2013, producto del funcionamiento de una fundición de minerales polimetálicos, además de ocasionar problemas a la salud a la población aledaña con plomo en la sangre.

Estudios previos señalan la dispersión geoquímica del río Pativilca donde los metales presentan una alta dispersión de los iones en arsénico (As), cromo (Cr), hierro (Fe), antimonio (Sb), vanadio (V), de mediana dispersión en cadmio (Cd), cobre (Cu), níquel (Ni), plomo (Pb), antimonio (Sb) y baja dispersión en molibdeno (Mo), estaño (Sn), antimonio (Sb), wolframio (W); y la contaminación por los metales en el río sobrepasan los valores permitidos, corriendo riesgo para la vida, en especial con la presencia de arsénico (Rivera, Ítalo & Casallo, 2011). En un informe de monitoreo de calidad de agua del río Pativilca por la Autoridad Nacional del Agua (2014), mostró en los resultados que a 500 metros antes de la desembocadura, el plomo y cadmio sobrepasan los estándares de calidad de aguas de la categoría 3 según la normativa del D.S. 002-2008-MINAM.

Se hace necesario buscar alternativas en la eliminación de los contaminantes, principalmente de los metales pesados producidos por las empresas y vertidos en los cuerpos de agua, para remediar los problemas existentes que causan problemas en los ecosistemas y en la salud de los seres humanos por el consumo de los alimentos contaminados por algún metaloide; además de disminuir el impacto de incidentes futuros.

El uso de microorganismos en la recuperación de las aguas contaminadas con metales pesados constituye una alternativa regularmente usada, debido a que resisten al efecto tóxico de algunos compuestos. La especie *Pseudomonas putida* refleja una capacidad para adaptarse a ambientes contaminados o sin contaminar, con condiciones fisicoquímicas diferentes y en continuo cambio. Estas bacterias son capaces de asimilar una gran variedad de nutrientes, entre ellos solventes orgánicos y compuestos tóxicos de diverso origen. Esta resistencia que poseen frente a las variaciones de temperatura y pH, produce mayor eficiencia al inmovilizar los microorganismos, debido al incremento de la concentración celular por unidad de volumen, causando que la velocidad de degradación y la reducción de los compuestos por volúmenes de agua sean mayor al tratar del mismo caudal (Pérez, Barraza & Martínez, 2015).

La inmovilización bacteriana es una técnica que garantiza que las células se mantengan adheridas a un soporte logrando con ello la reducción y degradación de compuestos más rápidamente, también presenta como ventajas una baja toxicidad y un bajo costo. Los resultados obtenidos podrán ser aplicados en tratamientos de aguas residuales procedente de río o de cuerpos de agua con altas concentraciones de metales de plomo y cadmio.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la capacidad de remoción de plomo y cadmio presente en el afluente del río Pativilca-Lima, mediante la cepa de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizadas.

Objetivos específicos

- a) Cultivar la cepa *Pseudomonas putida* bajo condiciones estándares de laboratorio
- b) Determinar la caracterización físico-química del afluente del río Pativilca, Barranca-Lima.
- c) Adaptación y selección de colonias de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 resistentes a altas concentraciones de plomo y cadmio.
- d) Implementar el mecanismo de inmovilización de la *Pseudomonas putida* ATCC 49128 con un soporte natural.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

Chen et al. (2005), en su investigación de la capacidad de biosorción de las *Pseudomonas putida* CZ1 en Cu (II) y Zn (II). La cepa fue aislada del suelo contaminado por actividades mineras, y sometida a distintas soluciones acuosas para la eliminación de los metales tóxicos, usando la biomasa de la bacteria de forma viva y no viva. La investigación mostró que el pH óptimo para reducir la concentración de Zn (II), tanto por células vivas y no vivas, fue de 5,0 mientras que en Cu (II) fue 5,0 pH en células vivas y 4,5 pH en células no vivas. Los datos de adsorción con respecto a ambos metales fueron procesados por el modelo matemático de la isoterma de Langmuir, mostrando que la capacidad de unión de las células vivas es significativamente mayor que la de las células no vivas en las condiciones probadas. Aproximadamente el 40-50 % de los metales fueron absorbidos activamente por la cepa *Pseudomonas putida* CZ1, y el resto se unió pasivamente a la bacteria. Agregaron ácido clorhídrico a una concentración de 0,1 M a las soluciones de metales de Cu (II) y Zn (II), causando un efecto de desorción en las células vivas con un resultado de 72,5 % y 45,6 % respectivamente, mientras que en las células no vivas fue de 95,3 y 83,8 % respectivamente. Los investigadores afirman que la desorción de los metales de células no vivas no son efectivas.

Mendoza et al. (2010), investigaron la biosorción de los metales en tres cepas de bacterias, donde aislaron las cepas bacterianas de suelos contaminados por hidrocarburo extraídos del municipio de Acatzingo del estado de Puebla, México. Identificaron a las cepas de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium violaceum* y *Burkholderia cepacia*. Sometieron 2 ml del inóculo de cada cepa a soluciones de cromo, plomo y arsénico por separados a concentraciones de 50 ppm y 100 ppm, y fueron incubados a 25 °C por el periodo de 7 días. El experimento reveló

que a la concentración de 50 ppm de los metales pesados, las cepas de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas mendocina* obtuvieron una mayor adsorción en plomo, sin embargo la más alta acumulación de plomo fue de *Pseudomonas mendocina* y *chromobacterium violaceum*; la mayor adsorción en arsénico mostraron a las *Pseudomonas mendocina* y *Burkhordelia cepacea*, y la mayor acumulación fue de *Pseudomonas mendocina*; en el caso del cromo la mayor adsorción fue de *Burkhordelia cepacea* y *Chromobacterium violaceum*, y la mayor acumulación fue de *Pseudomonas mendocina*. Los resultados de la investigación mostraron que las concentración inicial de 100 ppm del plomo con las cepas *Pseudomonas putida*, *Chromobacterium violacium* y *Burkhordelia cepacia* obtuvieron mayor acumulación de los iones entre 50 ppm y 80 ppm de plomo. La cepa de *Pseudomonas putida* mostró mayor capacidad de acumulación del cromo; y por último la acumulación de arsénico es mayor que la adsorción en todas las cepas bacterianas, y las cepas *Chromobacterium violacium* y *Burkhordelia cepacia* muestran una mayor capacidad en captar el arsénico y acumularlo a comparación de las otras cepas.

Tur, Orberá, Romagosa y Pérez (2013), Investigaron los efectos de la bioadsorción de plomo (II) usando la biomasa seca de las cepas de bacterias de *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044, *Bacillus subtilis* CCEBI 1032 y *Kluyveromyces marxianus* CCCEBI 2011 expuestas a medios acuosos con diferentes concentraciones de pH. En la experimentación los autores prepararon soluciones de nitrato de plomo regulando el pH con NaOH 0,01 N o HCL 0,01 N entre el rango de 4,0 – 6,0 unidades. Los microorganismos se usaron como material adsorbente con una biomasa seca de 0,6 g/L, cada una se depositaron en Erlenmeyers con la solución de Pb (II) a una concentración de 2,0 mg/L; los pH se ajustaron a 4,2; 5,2 y 6,2 unidades y se llevaron bajo agitación zaranda a 150 rpm durante una hora, a una temperatura de 32 °C. En la bioadsorción de plomo (II) mostró que la cepa *Bacillus subtilis* CCEBI 1032, redujo la concentración hasta un 1,66 mg/L del metal en un pH de 4,2 unidades, pero en pH de 5,2 resultó un valor bajo con 0,58 mg/L del metal y vuelve a subir el valor cuando el medio se encontró en un pH de 6,2 con una bioadsorción de 1,53 mg/L del metal. La cepa *K. marxianus* CCEBI 2011 en las tres diferentes unidades de pH el resultado fue una remoción superior de 90 % de plomo (II) obteniendo como el mayor valor de 1,94 mg/L en pH de

4,2 y 6,2 unidades. La última bacteria, la cepa *Pseudomonas auriginosa* CCEBI 1044, obtuvo el valor más alto con 97,4 % (1,96 mg/L) de remoción, en pH de 5,2 unidades, y su menor valor es de 80,2 % (1,6 mg/L) en pH de 6,2; los resultados de los investigadores afirman la concordancia con lo reportado con otros autores referente la adsorción de las especies del género *Pseudomonas*.

Singh y Gadi (2012), realizaron estudios en dos cepas de bacterias para determinar la biosorción de plomo (II) en biomasa muerta o no viva. Las cepas *Pseudomonas oleovorans* y *Brevundimonas vesicularis* fueron adquiridas a partir del banco genético de colecciones de cultivo microbiano, del instituto de Tecnología Microbiana (CSIR), Chandigarh, India. Las bacterias inoculadas en placas se incubaron a 25 °C de 24 y 48 horas. La obtención de la biomasa no viva de cada cepa de bacteria se separó del medio por centrifugación y se secó en horno de aire caliente a 60 °C por casi 48 horas. Los resultados muestran que las dos especies bacterianas presentan biosorción de plomo al contacto entre 20 minutos y 120 minutos, se observa un aumento al comienzo del experimento de la biosorción de plomo (II) y a los 90 minutos alcanza el equilibrio. Las bacterias sometidas a la solución de 4 a 6 pH, tiene una mayor biosorción a comparación de los pH de mayor valor. En condiciones de pH 6 a la dosis de biomasa de 0,1 g por 100 ml de solución de iones metálicos, a un tiempo de 90 minutos en contacto y a la concentración inicial del metal a 100 mg/L son los requerimientos favorables para la eliminación del plomo. Ambas especies se sometieron al agua residual que se obtuvieron del río Tawa a una distancia de 3 km de las minas de carbón; la *P. oleovorans* eliminó 55 %, mientras que *Brevundimonas vesicularis* el 53 % de plomo de las muestras.

Azoddein, Ahmad, Yunus y Sulaiman (2016), investigaron la resistencia de la cepa *Pseudomonas putita* ATCC 49128 a los metales pesados. El experimento consistió en el potencial de crecimiento en distintas concentraciones de mercurio y su resistencia al mercurio. El experimento consistió en someter a la cepa de bacteria en soluciones acuosas a concentraciones de 1,0 µM, 6,0 µM y 19,0 µM de mercurio, en condiciones óptimas de nutrientes, pH y otros factores físicos relacionados, además en agitación a 180 rpm a nivel de matraz y a una temperatura de 37 °C. Los resultados indican una tasa

de eliminación 99,0 %, 99,83 % y 98,25 % respectivamente, en las concentraciones de mercurio utilizadas en un periodo de 24 horas. Los investigadores desarrollaron otro experimento con las mismas condiciones óptimas de nutrientes y pH, a una agitación de 180 rpm a 37 °C, sometiendo a la cepa de bacteria a una concentración de 1000 µM de mercurio que obtuvo una remoción de 92,0% en las primeras horas y 98,0% al culminar las 28 horas.

Azoddein, Mamat y Athirah (2017), investigaron la reducción de mercurio en las aguas residuales de minería usando la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128. El experimento consistió en someter a la cepa bacteriana en solución acuosa a diferentes concentraciones de mercurio que fueron 3 ppm, 5 ppm y 7 ppm siendo expuestas a las temperaturas de 33 C°, 37 C° y 41 °C y a una agitación constante de 180 rpm. Los resultados mostraron que a temperatura de 33 °C en las diferentes concentraciones la remoción fue 50,31 %, 53,44 % y 24,66 % respectivamente; mientras que a la temperatura de 37 °C en las diferentes concentraciones la remoción fue 72,54 %, 65,85 % y 57,94 % respectivamente; a temperatura de 41 °C resultó la mayor remoción de mercurio, a comparación de las otras temperaturas, en las tres concentraciones diferentes con 73,21 %, 86,40 %, 92,59 %. El experimento muestra que la *Pseudomonas putida* tiende a preferir una mayor remoción de mercurio a la temperatura alta de 41 °C y concentraciones de 5 ppm y 7 ppm.

Bayona et al. (2009), investigaron la variación de los metales pesados en un tratamiento biológico con la cepa *Pseudomonas fluorescens*, formando un diseño de columna teniendo una altura de 2,10 m, de ancho 0,5 m y un volumen de 0,525 m³, los difusores se ubicaron en la parte superior para la distribución de la alimentación hacia el cuerpo de la columna. La película del inóculo se adhirió a los materiales empacados con materiales de PVC lámina preforma que ofrece suficiente área de contacto. Durante el tratamiento midieron el pH, partiendo de un valor inicial de 6,10 e incrementándose a las 24 horas a 7,32 y al finalizar las 48 horas del tratamiento se registró un valor final de 7,53. Estos resultados revelaron que la cepa prefirió aumentar el valor de pH en el tiempo, logrando alcanzar el rango óptimo para el propio crecimiento poblacional de la

bacteria, además efectuar la hidrólisis de ácidos grasos, proteínas y materia orgánica. Se realizaron ensayos a nivel de matraz, obteniendo la reducción de la concentración de los metales de hierro (91,77 %), zinc (86,36 %), cromo (77,27 %), plomo (68,18 %), níquel (78,94 %) y cadmio (50,0 %). En el experimento de la columna de agua con metales pesados obtuvieron una remoción de hierro (90,40 %), zinc (95,30 %), cromo (86,04 %), plomo (88,54 %), níquel (84,84 %), cadmio (66,66 %). Los porcentajes de remoción fueron óptimos y comprueba una gran capacidad de biodegradación de la bacteria.

Hussein, Ibrahim, Kandeel y Moawad (2004), investigaron la resistencia de 4 cepas de bacterias del género *Pseudomonas* a los metales pesados de la planta de tratamiento de aguas residuales del oeste de Alejandría, Alejandría, Egipto. Las cepas se caracterizaron e identificaron como *Pseudomonas fluorescens* y otras tres cepas de la especie *Pseudomonas putida*. La solución del metal se almacenó en un envase de vidrio y una bomba peristáltica que hacía fluir la solución en el reactor y esta estaba regulaba a cierta velocidad de flujo. Por otro lado, la biomasa para la adsorción de metal se suministra desde un recipiente de almacenamiento y una bomba peristáltica de funcionamiento continuo, la cual transfirió la biomasa desde el envase de almacenamiento hacia el reactor. Los investigadores evaluaron la capacidad máxima de adsorción, resultando el Ni (II) como la más alta, seguida de cadmio (II), cobre (II) y cromo (VI). Sin embargo, la constante k-Freundlich reflejo que la mayor adsorción fue de cadmio (II) a comparación de los otros metales. Los autores argumentan la presencia de cualquier otro ión en el medio o mezcla puede resultar un efecto antagonista sobre los procesos de biosorción de los metales de cadmio (II) y níquel (II).

Shirdam, Khanafari y Tabatabaee (2006) investigaron la presencia de bacterias marinas tolerantes y con la capacidad de eliminar metales pesados. Las muestras compuestas de sedimentos y agua fueron extraídas en la zona húmeda del este de Anzali del Mar Caspio, Irán; seguidamente las muestras fueron colocadas en placas sobre medio agar BHI, luego aislaron y purificaron los cultivos; las placas se llevaron a la incubadora por un periodo de tiempo de 72 horas. Encontraron siete cepas tolerantes, dentro de las cuales la *Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

crecieron con mayor rapidez y mostraron elevados niveles de absorción en las placas, la primera con 45 % en cadmio y 6,5 % en níquel, la segunda cepa se obtuvo 10 en vanadio, y la última cepa la absorción de cadmio, níquel y vanadio fueron 60 %, 17 % y 32 % respectivamente. Para conocer la eficacia de la absorción en las cepas bacterianas se inmovilizaron en alginato de calcio, los resultados demostraron que el 90 % de cadmio y el 45 % de níquel fueron removidos por la *Pseudomonas putida*; el vanadio fue removido al 100 % por la cepa de *Bacillus cereus*; y con la cepa *Pseudomonas pseudoalcaligenes* obtuvieron la remoción del cadmio, níquel y vanadio fue al 90 %, 50 % y 95 % respectivamente.

Konig, Pernyeszi, Kocsis y Hegedusova (2011), usando células liofilizadas de *Pseudomonas aeruginosa* investigaron el tiempo de bioadsorción de cadmio (II) y plomo (II), y su concentración en diferentes niveles de pH. Las células fueron incubadas por 38 horas en la fase estacionaria temprana y se centrifugaron a 10000 rpm por 30 minutos, posteriormente las células se enjuagaron dos veces usando solución salina fisiológica, después realizaron el proceso de liofilización y por último la centrifugación. Ejecutaron mediciones de adsorción con soluciones de 25 mg/L y 50 mg/L, en rangos de pH de 3,0 – 8,0, con el fin para determinar el rango óptimo de pH. El estudio resultó que las células tienen capacidad de adsorción concentraciones altas; el rango óptimo de pH para la biosorción de cadmio (II) fue de 4,0 – 7,0 y para el plomo (II) entre 4,0 - 5,0; además la concentración se redujo considerablemente en los primeros 10 minutos y se mantuvo casi constante después de 20 minutos, concluyendo en el estudio que la saturación se alcanzó a los 20 minutos de la biosorción y fue muy rápida. Por último, los autores estimaron la capacidad máxima de la captación de los iones de plomo (II) y cadmio (II), obteniendo un resultado de 164 mg/L y 132 mg/L respectivamente.

Pardo, Herguedas, Barrado y Vega (2003), investigaron la biosorción de cadmio, cobre, plomo y zinc, con células de *Pseudomonas putida* liofilizadas. La bacteria fue cultivada en matraces a 30 °C a 200 rpm por el tiempo de 24 horas; para el crecimiento de las bacterias usaron agar tripticosa de soja (TSA) y caldo tripticosa de soja. Durante el proceso de liofilización de las células estas fueron llevadas a temperaturas entre -40 °C

a -50 °C a una presión de 0,01 bar, al culminar el proceso las células se redujeron a polvo manteniéndose almacenadas a -3 °C. Las soluciones de los metales fueron de 1 g/L. Los análisis revelaron que el tiempo de reacción en los metales llegaron a un valor aproximado de 5 minutos, eliminando más del 80 % de los iones de los metales, alcanzando el equilibrio a los 10 minutos después del contacto; además, los valores de pH óptimos para la adsorción de la biomasa en cadmio (II), cobre (II), plomo (II), zinc (II) resultaron 6,0; 5,0 – 6,0; 6,0 – 6,5 y 7,0 – 7,5, respectivamente. Los investigadores concluyeron que la *Pseudomonas putida* es capaz de retener iones de metales incluso a niveles de concentraciones altas.

Khan y Ahmas (2006), los investigadores usaron la *Allium cepa* como prueba de destoxificación del agua, mediante la inhibición de la cantidad de raíces; así que aislaron la *Pseudomonas fluorescens* de muestras de suelo en el área industrial de Aligarh, India. Las cepas fueron inmovilizadas con 0,1 ml de células en suspensión en gel de alginato de sodio, se formaron esferas o perlas que se expulsa gota a gota a través de una jeringa, manteniéndose en suspensión en la solución de cloruro de calcio. Debido a su resistencia a los distintos agentes xenobióticos la bacteria fue sometida a 0,3 ml a diferentes concentraciones de metales pesados (cadmio, cromo, cobre, níquel, plomo), pesticidas (Hexacloruro de benceno, 2,4-diclorofenoxi ácido acético) y fenoles (catecol, cresol, fenol y resorcinol). La prueba de *Allium cepa* mostraron resultados de toxicidad al 62,5 % en la mezcla de metales pesados, 71,9 % para los pesticidas, 73,2 % en fenoles y para el caso de la combinación de todos los tóxicos fue de 58,5 %. La prueba resultó eficiente para algunos metales estimando el 75,9 % para cadmio, 61 % para plomo y 74,2 % para cromo.

1.2. BASES TEÓRICAS

1.2.1. Cuenca

La Cuenca Hidrográfica puede referirse a la unidad de un territorio natural que capta y concentra las precipitaciones, formando escorrentías que se desplaza hasta un punto donde se drena en un cauce principal; además es considerada un espacio

social donde existe interacciones entre los recursos naturales y los habitantes en condiciones sociales, físicas, biológicas, económicas y culturales que adjudica características propias de la cuenca (Brooks, 1985, citado por Enríquez, 2012, p. 6; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2007).

Una cuenca hidrográfica tiene sus límites que establecen que las parteaguas empezando desde el escurrimiento del agua que precipita en el área delimitada por éste, hasta llegar a un punto de salida. La abundancia y dominancia de las especies de la flora y fauna depende según el clima predominante en la cuenca, incluso puede convertirse en un desierto a excepción en los periodos de precipitaciones (lluvia y granizo) con gran intensidad. La variedad de franjas de vegetación está ligado a las gradientes de altitud, temperatura y lluvias, formando diversos ecosistemas que incluye los ecosistemas terrestres (pastizales, selvas, bosques, matorrales, manglares, entre otros) y los ecosistemas acuáticos (ríos, lagos, quebradas, humedales, bofedales, embalses, etc.). Debido a las descargas hídrica y otros procesos biofísicos, regularmente están entrelazadas las franjas de vegetación con los ecosistemas “verticales” complejos que se forman a lo largo de la cuenca, junto a los nichos ecológicos y variedad de ecotipos (Carabias y Landa, 2008, citados por Paré & Gerez, 2012, p. 26; FAO, 2009).

La cuenca hidrográfica está dividida en tres sectores diferenciados y definidos como alto, medio y bajo; con características topográficas únicas del medio con funciones que logran influir o contribuir en los distintos procesos hidrometeorológicos y en el uso de sus recursos (Llerena, 2003, citado por Ordoñez, 2011, p. 9). Las cuencas tienen un rol territorial altitudinal, a razón que implica un vínculo o relación directa con las partes altas, adyacente al parteagua, la zona de tránsito o intermedia y la parte baja de deposición y desembocadura, de forma que la parte baja es afectada por la parte alta (Ordoñez, 2011).

La Contaminación del agua puede definirse como la alteración de su calidad natural por las actividades antropogénicas (Arevalo, 2015). Las aguas superficiales contaminadas, son producidas por la acción del hombre por la presencia de compuestos o elementos que normalmente no se encontraría o están en concentraciones mayores a lo normal (Graza, 2015). Los ríos poseen la particularidad de concentrar los contaminantes presentes en la cuenca y afecta algunos puntos principales en la costa marina, donde existen especies altamente sensibles tanto de agua dulce como salada (Kramer, Chouhury y Kampa, 2000, citados por Escobar, 2002, p. 13). Las aguas superficiales afectadas, ya sea de manera directa o indirecta, involucra factores que influyen en la calidad del medio acuático que causa impactos negativos a la flora y la fauna presente, y alteraciones físico-químicas del agua. Sin embargo, hoy en día, la preocupación lo conforma la utilización del agua como recurso en el consumo directo e indirecto por las actividades humanas; a razón de un mayor interés en la calidad del agua (Kiely, 1999).

El uso del agua doméstico, industrial y agrario causa enormes volúmenes de residuos que son eliminados por las vías fluviales, las cuales están siempre disponibles (Kiely, 1999). Se estima que solo aproximadamente el 2 % de las aguas servidas contaminadas son tratadas en América Latina, por ese aspecto se le atribuye una de las principales fuentes de contaminación de los ríos (González, 2015). Los metales pesados en aguas superficiales se encuentran en forma de coloides, partículas y también en fases disueltas, sin embargo, la baja solubilidad de estas últimas mencionadas suelen mostrarse en concentraciones mínimas de manera iónica o complejos organometálicos. El pH controla la solubilidad de los metales pesados presentes en las aguas superficiales y el tipo de ligantes en los que se hallan adsorbidos (Corro, 2015).

1.2.1.1. Cuenca Pativilca

Según Rivera, Ítalo & Casallo (2011, p. 30):

La cuenca del río Pativilca pertenece a la vertiente del Pacífico y drena un área total de 4 837 km². Políticamente, se localiza en los departamentos de Ancash y Lima, comprendiendo las provincias de Recuay y Bolognesi en el Departamento de Ancash y Cajatambo y Barranca en el Departamento de Lima. Altitudinalmente, se extiende desde el nivel del mar hasta la línea de cumbres de la cordillera Occidental de los Andes, cuyos puntos más elevados están sobre los 4 000 msnm.

Esta cuenca que tiene sus orígenes en las alturas de los nevados de Cajatambo, discurriendo sus aguas por la quebrada Pischcaragra, la que da nacimiento al río en su confluencia con la quebrada de Gara, cerca de la localidad de Pachapaqui. Durante su recorrido, recibe el aporte de numerosos, entre los cuales cabe mencionar por la margen derecha, las quebradas de Picharagra (206 km²), Desagüe (60 km²). Quebrada de Mashcus (252 km²) y los ríos Llamac (288 km²), Rapay (729 km²) y Gorgor (566 km²).

El río Pativilca, presenta una pendiente de 3 % y aumenta hasta el 14 % entre las nacientes de la quebrada Llata y que se junta con la quebrada Huanchay. El río presenta un recorrido de 164 km, y geográficamente los puntos extremos de la cuenca se encuentra entre los 6° 50" y 10° 55" de latitud sur y los meridianos 76° 45' y 77° 50', de longitud oeste. El modo que se origina este recurso es mediante los deshielos de los nevados localizados principalmente en la parte alta de la cuenca, y también por las precipitaciones estacionales que ocurren en las faldas de la cordillera de los andes (Apéndice 32). El río Pativilca es de régimen irregular al igual que la mayoría de los ríos costeros, y de carácter tormentoso (Rivera, Ítalo & Casallo, 2011).

1.2.2. Eutrofización y nutrientes

El nitrógeno y el fósforo son los nutrientes más importantes y esenciales para el crecimiento de las plantas y organismos; pero el exceso puede conducir a causar la eutrofización. Este efecto por la presencia elevada de los nutrientes puede ser de forma natural o antropogénica (actividades agrarias, vertido de aguas residuales, fertilizantes, entre otros). La contaminación producida por los seres humanos en el caso de lagos o aguas costeras es transportada por la cuenca de los ríos de fuentes difusas por actividades agrícolas, cría de ganado, cría de aves, cría de cerdos, labranzas y silvicultura. Los efectos en los lagos por la eutrofización causan un aumento en el crecimiento de la vegetación y reducción de transparencia de luz debido al incremento de turbidez en el agua; en los ríos puede incluso provocar el crecimiento extremo de macrófitos, también de algas del género *Cladophora*, en especial al recibir grandes volúmenes de vertidos y aguas residuales (Mason, 1991; citado por Kiely, 1999, p. 378). El alto contenido de los nutrientes o en los ríos o lagos causa una fertilización excesiva de las aguas, dando como consecuencia la disminución de concentración de oxígeno disuelto (Wetzel, 1981; González & Saldarriaga, 2008).

Los peces son intoxicados por el nitrógeno en forma de amoníaco, ya que ejerce una demanda de oxígeno en el agua. Mediante procesos biológicos denominado nitrificación/desnitrificación el nitrógeno puede removerse del agua (Valdez & Vázquez, 2003). La desnitrificación se activa en medios a concentraciones bajas de oxígeno principalmente ocurre con los microorganismos aerobios; en cambio la nitrificación se realiza en presencia de oxígeno (Pérez, Dauntan, Contreras & González, 2002). Las bacterias que pueden nitrificar el agua son principalmente los pertenecientes a los géneros de *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* y *Nitrobacter*; como también las bacterias con capacidad desnitrificantes se tienen los géneros de *Rhizobium*, *Thiosphaera*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Thiobacillus* y *Paracoccus* (Venegas, 2015).

El fósforo tiene un rol muy importante en los procesos celulares de los microorganismos realizando la transferencia de energía. Entre el 1,5 – 2,0 % representa el fósforo en peso seco de los microorganismos. Sin embargo, las bacterias eliminadoras de fósforo acumulan mayores cantidades que fluctúan entre 3 y 6 % del peso seco de la biomasa (Sedlak, 1991, citado por Venegas, 2015, p. 34). Los microorganismos con la capacidad de almacenar y eliminar fósforo son *Acinetobacter*, *Pseudomonas vesicularis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus*, *Aeromonas hydrophila*, *Arthrobacter globiformis*, *Moraxella sp.* y *Enterobacter sp* (Castillo & Tejero, 1999).

1.2.3. Calidad del agua

La calidad del agua puede definirse como la función de un conglomerado de características físico-químicas o microbiológica, ya sea, sus valores de aceptación o de rechazo. La calidad físico-química del agua consiste en la determinación de una sustancia o elemento químico específico que pueda perjudicar o sea letal para salud humana (OMS, 2006, citado por Zhen, 2009, p. 6).

El agua de las aguas superficiales simplemente es la conformación del ecosistema acuático donde se desarrollan diversas comunidades vivas que dependen de las características físico-químicas de sus aguas y la alteración de estas puede verse notablemente. La alteración de estos elementos conlleva a una contaminación donde se produce malos olores, cambio de temperatura, transparencia del agua, pH, demanda de oxígeno biológico, aumento de los nutrientes como el fósforo y nitrógeno la variación de estos elementos repercute en la biota (López, Pujante, Ribarrocha & Tapia, 1995)

1.2.4. Metales Pesados

La definición de “Metal pesado” es arbitraria y ambiguo dependiendo de cada autor, sin embargo, puede definirse como un elemento que posee propiedades metálicas entre las cuales se tiene la densidad, ductilidad, conductividad, estabilidad como catión, ligando y entre otras. Dentro de la tabla periódica tiene un grupo de 65

elementos químicos y el número atómico sobrepasa los 20, además en su forma elemental tiene una densidad alta que iguala o supera a 5 g/cm^3 . Estos elementos son capaces de formar complejos como iones libres o participar en reacciones redox con distintos reactivos que estén presentes en el medio, resultando ser potencialmente tóxicas para la biota (Beltrán & Gómez, 2016).

Las industrias y sus actividades por producir un bien o servicio generan vertimientos y emisiones de contaminación a gran escala hacia al medio ambiente por metales pesados, entre los sobresalientes está cobre, cadmio, cobalto, cromo, níquel, mercurio, plomo, plata, zinc, entre otros. Al encontrarse en el medio ambiente ocasiona pérdida de fertilidad en el suelo y su posterior uso por la presencia de estos elementos; mientras los cuerpos de agua son seriamente comprometidos, vulnerando el recurso que usa los seres humanos para su consumo, además de afectar a las especies en los ecosistemas produciendo como consecuencia un bloqueo en las actividades biológicas o la inactivación de enzimas causando la toxicidad (Vullo, 2003).

La alta toxicidad de los metales pesados resulta alarmante la exposición prolongada o la bioacumulación que puede causar serios problemas en la salud humana. Dependiendo el metal expuesto pueden producir afecciones o enfermedades, incluso en desarrollar cáncer (Reyes, Vergara, Torres, Díaz & González, 2016).

Los metales pesados son elementos perennes, no pueden ser creados, degradados e inmutables, ni por procesos biológicos y tampoco antropogénicos. En el momento que entra el elemento en los ecosistemas acuáticos a través de procesos biogeoquímicos, se transforma y distribuyen entre diversas especies con diferentes características físico-químicas. Durante los cambios en estados de óxido-reducción de los elementos pueden trasladarse tanto en el suelo, aire y agua, incluso integrarse a los seres vivos mediante la cadena trófica. La contaminación de metales en el medio acuático ocasionado de forma natural o antrópica perjudica severamente a la

seguridad alimentaria y la salud pública (Covarrubias, García & Peña, 2015; Reyes et al., 2016).

1.2.4.1. Plomo

El plomo pertenece al grupo de los metales pesados con símbolo está representado de Pb, en la tabla periódica tiene un número atómico de 82, y peso atómico o masa atómica de 207,2 u, presenta una coloración gris, tiene la característica de ser blando y maleable, además en el medio ambiente puede ser encontrado en diversas sales, óxidos y compuestos organometálicos (Azcona, Ramírez & Vicente, 2015; Londoño, Londoño & Muñoz, 2016).

Desde tiempos antiguos, el plomo es uno de los primeros metales en ser utilizados por el hombre, y es encontrado en diversas partes mundo para diversos propósitos en la actualidad. Galena es considerado el mineral con mayor concentración de plomo (sulfuro de plomo), entre otros minerales con menor proporción o concentración se tiene a la cerusita, anglesita, corcoita, wulfenita, piromorfita, mutlockita u nanadinita. Dentro de los minerales pueden estar presentes otros metales (Organización Internacional del Trabajo [OIT], 1998; Ramírez, 2005).

Las industrias químicas o de construcción utilizan el plomo metálico en forma de plancha o tubos, por la necesidad de usar un material con la propiedad de una gran maleabilidad y resistencia frente a la corrosión. El uso del metal ha ido en aumento dentro de las últimas cinco décadas mediante el empleo de baterías, el recubrimiento de cables eléctricos, los aditivos o compuestos en los combustibles, en la elaboración de los explosivos y las municiones, incluso en su uso en plaguicidas, pinturas y reactivos. Los productos mencionados han aportado a la contaminación de los recursos naturales; se calcula que más de 7 millones de tonelada métricas (TM) de plomo son usados en la industria anualmente (OIT, 1998; Ramírez, 2005; Herrera, 2014; Hynek et al., 2011).

La extracción de plomo se lleva a cabo en más de 40 países, siendo los mayores productores de plomo en el mundo los países de China (30 %) y Australia (22 %); mientras que América Latina contribuyó con el 15 % de producción de plomo a nivel mundial en el año 2008, la cual el Perú es el principal país que aportó una producción de 345,109 TM, seguido de México con 100,725 TM (PNUMA, 2010). En el año 2011, el Perú tuvo un retroceso en la producción de plomo, sin embargo, a partir del 2012 comenzó aumentar la constante de producción, alcanzado en el 2015 un nivel de 315,7 TM y en 2016 en un nivel de 314 TM, posicionando en cuarto lugar al país como productor de plomo dentro del ranking mundial de producción minero (Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería [OSINERGMIN], 2016; OSINERGMIN, 2017; Ministerio de Energía y minas del Perú [MINEM], 2017).

El plomo es un metal pesado ubicuo, no tiene funcionalidad esencial en los metabolismos dentro de los procesos o sistemas biológicos. En el presente, es hallado tanto en el ambiente urbano como rural. Aunque, los ambientes laborales son las principales exposiciones, como también la consideración significativa toxicológica de las exposiciones alimentarias y domésticas (Ramírez, 2005).

El plomo, una sustancia tóxica, genera bioacumulación a distintos niveles tróficos. Las concentraciones más altas del contaminante pueden hallarse en los depredadores como parte superior de la cadena alimentaria, véase en la Figura 1. El metal no se desplaza por vía terrestre en el medio ambiente a largas distancias, por vía atmosférica los compuestos de $PbSO_4$ y $PbCO_3$ se encuentran en forma de partículas en la atmósfera, que es posible que se dispersen y se desplacen durante tormentas de polvo, de esa forma se liberan aproximadamente 1,7 millones de toneladas de plomo. Los compuestos también pueden llegar a la superficie mediante lluvias en concentraciones de 1

a 3 mg/L. El desplazamiento del plomo por ríos y lagos tiene una importancia debido al transporte a escalas regionales y nacionales. Son influenciados por diferentes factores, tales como la salinidad, pH, sorción y procesos de biotransformación. Comúnmente se encuentra presente en un medio acuático ácido en forma de compuestos de sulfato de plomo (PbSO_4), cloruro de plomo (PbCl_4), plomo iónico y también en formas catiónicas de hidróxido de plomo e hidróxido ordinario ($\text{Pb}(\text{OH})_2$). El desplazamiento acuático transporta miles de toneladas al año (Hynek et al., 2011).



Figura 1. Transporte y ciclo de la contaminación por plomo.

Fuente: Hynek et al., 2011.

El plomo (II) tiene la capacidad de interferir en los sistemas enzimáticos causando la toxicidad por el metal y una variedad importante de efectos tóxicos (Ramírez, 2005). La Organización Mundial de la Salud [OMS] (2013), señala

que el plomo se acumula en el organismo y daña a múltiples sistemas orgánicos, entre ellos son el neurológico, hematológico, gastrointestinal, cardiovascular y renal.

Los efectos perjudiciales hacia la salud por la exposición al plomo van a depender de la concentración del metal que ha sido expuesto y el tiempo que se mantuvo en contacto con el metal. Al encontrarse expuesto con el metal, puede ingresar al cuerpo del ser humano mediante la ingesta de alimentos o agua. La absorción por ingesta es aproximadamente del 10 % en adulto y aumenta al 50 % en el caso de los niños y mujeres embarazadas; este porcentaje aumenta significativamente bajo condiciones de ayuno y por déficit de hierro o calcio. Los niños expuestos a la contaminación son especialmente vulnerables, causando efectos neurotóxicos del plomo, incluso provoca retraso del desarrollo mental e intelectual. El metal se deposita en mayor proporción en los huesos por un periodo de hasta 20 años, interfiriendo en la función del calcio, ya que este elemento es químicamente similar al plomo (OIT, 1998; OMS, 2013; Londoño et al., 2016; Herrera, 2014; Pájaro, Maldonado, Pérez & Díaz, 2013).

El metal se une a las proteínas de los grupos sulfhidrilo, con la posibilidad que modifique su estructura y su función, como también competir con distintos metales esenciales. El plomo posee un gran porcentaje de afinidad por los eritrocitos, y una pequeña parte restante al plasma; ya estando en el torrente sanguíneo se distribuyen en la sangre, los tejidos blandos y tejidos mineralizados. Aproximadamente el 95 % de la carga corporal en adultos, se encuentra en los tejidos mineralizados, como los huesos y dientes (OIT, 1998; Pájaro et al., 2013).

La exposición crónica usualmente causa anemia, o provoca trastornos neurológicos, como cefalea, irritabilidad, letargo, convulsiones, debilidad

muscular, ataxia, temblores y parálisis. En cambio, la exposición aguda ocasiona trastornos gastrointestinales, daño hepático y renal, hipertensión y trastornos neurológicos, como convulsiones, incluso provocar la muerte. Los síntomas para detectar la intoxicación son relativamente inespecíficos, causando dificultad a los médicos para llegar al diagnóstico, y por esa razón se emplea mediciones de la concentración de plomo en sangre (OMS, 2013; Azcona et al., 2015).

1.2.4.2. Cadmio

El cadmio es un metal pesado representado con el símbolo Cd, con un peso atómico de 112, un número atómico de 48, la densidad de $8,624 \text{ g/cm}^3$, presenta coloración blanca ligeramente azulado. Los principales minerales donde se encuentra en mayor proporción están en la greenokita (CdS), otavita (CdCO_3) y Monteponita (CdO). El metal se encuentra mucho más asociada en los yacimientos de zinc en el mineral esfalerita. Es común que forme parte de casi todos los componentes del zinc, y puede alcanzar a contener un 0,1 a 0,3 % de cadmio, incluso es encontrado en minerales de plomo y cobre en concentraciones mucho más bajas (Agency For Toxic Substances And Disease Registry [ATSDR], 2012; Londoño et al., 2016; Ramírez, 2002).

El cadmio es conseguido como subproducto mediante el proceso de la fundición y refinado de los minerales, como el zinc y plomo. El metal es muy resistente a la corrosión y es utilizado para el galvanizado y recubrimientos; la elaboración de pigmentos, pinturas, tintes, plásticos, tintas de impresión, caucho, lacas, baterías de níquel y cadmio; en aleaciones con cobre, aluminio y plata. El cloruro de cadmio es una sal usada como fungicida, colorante en pirotecnia y en las soluciones de estaño (Ramírez, 2002; OIT, 1998). En el año 2008, la producción primaria mundial de cadmio aumentó a 19,600 TM, con los países de China (4,300 TM), Japón (2,116 TM) y la república de Corea (2,900 TM) como principales productores primarios. En América Latina la producción primaria del metal en el país de México representa con 1,605 TM

y Perú con 371 TM (Pérez & Azcona, 2012; PNUMA, 2010); ocupando el Perú el sexto lugar en el año 2016 como productor de cadmio dentro del ranking mundial de producción minero, y segundo lugar a nivel de América Latina (MINEM, 2017).

La contaminación que se emite a la atmósfera comúnmente por las partículas de la combustión, siendo de forma gaseoso al ser enfriado se une rápidamente a las partículas, por lo que se rige en el mecanismo de transporte de aerosoles por desplazamiento de partículas atmosféricas, véase la Figura 2. La aplicación de fertilizantes de amonio y fósforo es otro ingreso de importancia en el suelo, dependiendo la medida del pH, el cadmio puede absorberse sobre minerales arcillosos, carbonatos u óxidos hidratados de hierro y manganeso o puede precipitarse como carbonato de cadmio, hidróxido y fosfato. La solubilidad del cadmio puede aumentar en condiciones ácidas, produciendo baja adsorción del metal por los coloides del suelo, los óxidos hidratados y materia orgánica. En los medios acuáticos el metal puede tener mayor movilidad en condiciones de bajo nivel de pH, bajos de dureza y bajos de materia orgánica en suspensión. El cadmio en su forma iónica libre es fácilmente absorbido por los organismos presentes en el sistema acuático (Hynek et al., 2011; PNUMA, 2010).



Figura 2. Contaminación por cadmio: transporte y ciclo.

Fuente: Hynek et al., 2011.

Las actividades industriales ligadas a las actividades y producción del cadmio son fuentes de emisiones a la atmósfera y de contaminación en los recursos hídricos. Los ríos contaminados pueden llegar a formar parte de la irrigación de los cultivos, además este metal es capaz de formar compuestos al combinarse otros elementos, y unirse fuertemente a las partículas del suelo; las concentraciones del suelo también están ligada del uso de fertilizantes químicos y la deposición atmosférica. El cadmio puede estar presente en el medio ambiente por medio de eventos que dan como resultado de erupciones volcánicas, incendios forestales y entre otros fenómenos naturales. La concentración en el suelo está ligada a los distintos factores, principalmente por la adición de fertilizantes a base de fosfatos. Debido a la similitud del metal con el zinc, provoca que la planta absorba el cadmio en vez del zinc. La concentración de la biodisponibilidad del cadmio aumenta en el suelo cuando

el pH del suelo disminuye (Martínez, Souza, Bucio, Gómez & Gutiérrez, 2013).

El ser humano al ingerir cadmio, la adsorción gastrointestinal en condiciones normales es de 2 a 6 % aproximadamente. Las personas con una reducción de concentración de ferritina, debido a que poseen a escasas reservas de hierro en su organismo, presentan una absorción de hasta 20 %. La exposición por vía respiratoria puede absorber concentraciones significativas, a consecuencia de inhalar el humo de tabaco y al polvo de cadmio por exposición laboral. Se calcula que el 20 % al 50 % es la absorción pulmonar por la explosión de polvo de cadmio atmosférico. Después de la absorción, sin importar la vía, el metal se traslada por el torrente sanguíneo, ligado con las células hemáticas y albúmina, hasta llegar al hígado. Desde ahí inicia la producción de la proteína metalotioneína con bajo peso molecular que se une al cadmio; el 80 % al 90 % se considera que se une con el metal, evitando la aparición del efecto tóxico de los iones de cadmio libres. Por último, es expulsado por la orina al filtrarse a través de los glomérulos. El proceso de la eliminación es muy lento, y por esa razón se acumula en el organismo, se calcula que este proceso puede durar entre los 7 y 30 años (OIT, 1998; Pérez & Azcona, 2012).

Los principales órganos que afecta el cadmio son los riñones, huesos y los pulmones. El hígado y riñones son los principales órganos en donde el metal se almacena, uno de los primeros indicios más comunes, debido a la exposición por mucho tiempo, es el daño que sufre la función renal y también de tubulointersticial. Los efectos que se producen por inhalación no son muy bien definidos desde el comienzo, pero después se distingue manifestándose por fiebre, alteraciones digestivas, dolor torácico, disnea edema agudo de pulmón, lo cual lograría causar fallecimiento por la insuficiencia respiratoria. Además, puede ocasionar anemia, albuminuria, hepatitis y anuria, ocasionando hepatonecrosis llevando a la persona a la muerte. El caso por ingestión los síntomas se manifiestan con náuseas, vómito, dolores abdominales y cefalea,

también es muy frecuente la diarrea intensa más colapso. Se estima que los síntomas surgen al ingerir los alimentos o bebidas con cadmio mayor a 15 ppm (Pérez & Azcona, 2012).

Los efectos crónicos en trabajadores por la exposición del cadmio, conlleva a un síndrome con enfermedad de los túbulos renales y enfisema pulmonar; además de otros efectos, como anemia, cambios en el metabolismo de los minerales y alteraciones hepáticas. Al cadmio se ha asociado el aumento de incidencias de cáncer de pulmón y prostático, por consecuencia a la inhalación de cadmio por exposición laboral (Pérez & Azcona, 2012).

1.2.5. Bacterias

El dominio de las bacterias son microorganismos pertenecientes al reino procariota, capaces de replicar su ADN al mismo tiempo que se reproducen mediante fisión binaria, así que cada célula hija tendrá el mismo genoma. Este dominio comprende una vasta diversidad de procariotas. Dentro de la gran variedad de morfología y fisiologías de especies de las bacterias, se encuentran especies que causan enfermedades (patógenos), como también otras especies no patógenas (Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009).

La división Proteobacterias constituye la división más amplia dentro de las bacterias (Figura 3). Dentro de Proteobacterias se encuentran muchas bacterias quimiorganótrofas, fotótrofos y quimiolitótrofos. Las bacterias frecuentemente son halladas en suelo y en el agua, y especies que viven en las plantas o en los animales, ya sea como enfermedades o de modo casual. Algunas de las especies, en el caso del género *Pseudomonas*, poseen la capacidad de degradar compuestos orgánicos complejos y tóxicos, tanto naturales como sintéticos, otros como el género *Azotobacter* realiza funciones de fijar el nitrógeno en estado libre (Madigan et al., 2009).

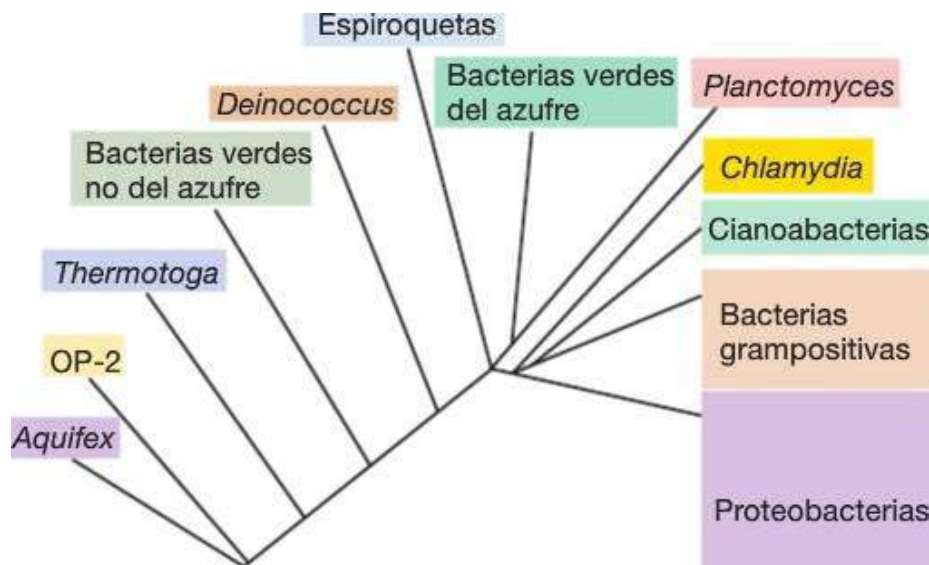


Figura 3. Árbol filogenético del dominio Bacterias.

Fuente: Madigan et al., 2009.

En la Figura 3 muestra los tamaños relativos de los recuadros coloreados señalan el número de géneros y especies que se conocen actualmente en cada grupo, en el caso de la Proteobacterias son el grupo más amplio de Bacterias. Este árbol no se indica todos los grupos conocidos de las bacterias (Madigan et al., 2009).

Entre los procariotas se presentan morfologías variadas y las más frecuentes se describen mediante términos que forman parte del léxico básico de los microbiólogos, las principales se representan en la Figura 4. Una bacteria con morfología esférica u ovoide se llama coco, y si tiene la apariencia cilíndrica se denomina bacilo. Algunos bacilos se arquean en forma espiral y se denomina espirilos. Las espiroquetas tiene el aspecto de sacacorchos, otras de las bacterias puede observarse con apéndices que presentan protuberancias celulares en forma de largos tubos o tallos; bacterias que se distinguen por la apariencia filamentosas que forman células largas y delgadas o cadenas de células. Las células de muchos procariotas se mantienen juntas después de la división celular generando grupos, y estas asociaciones frecuentemente son características de diferentes géneros. Por ejemplo, algunos después de su división permanecen en pares como los dicocos (entre ellos está el género *Neisseria*), también hay tetracos que son cocos se dividen en dos direcciones perpendiculares formando una agrupación de cocos en

una disposición cuadrada, otros cocos se dividen en un solo plano formando una secuencia de células como si fuera largas cadenas como *Streptococcus*, incluso otros se disponen en agrupaciones cúbicas tridimensionales (como *Sarcina*), y por último cocos que forman conjuntos o agrupación irregular de cuatro o más y se asemejan a la apariencia de racimos de uvas (como *Staphylococcus*) (Madigan et al., 2009; Vargas & Kuno, 2014).

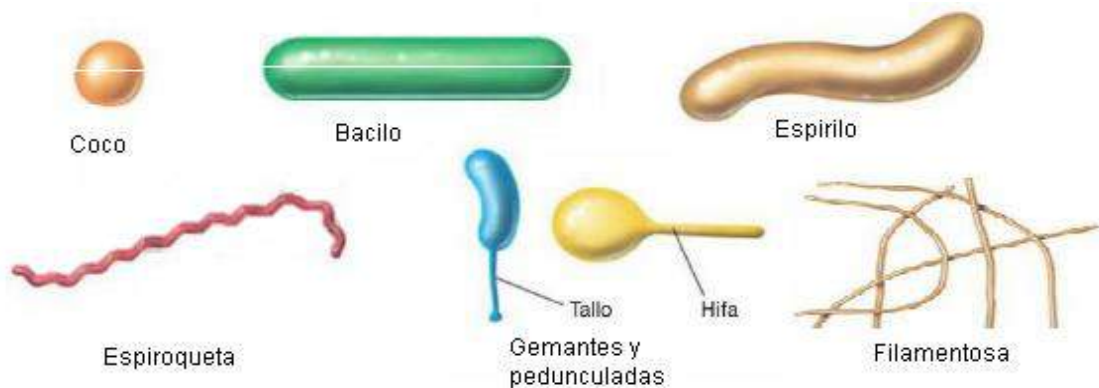


Figura 4. Morfología representativa de las células procariontas.

Fuente: Madigan et al., 2009.

Las bacterias se dividen en dos grupos, las grampositivas y las gramnegativas. La distinción básica entre estos dos tipos se basa en la aplicación de la técnica de tinción de Gram, que resulta diferentes reacciones. Los fundamentos de diferenciación entre bacterias de estos dos grupos son debido a la estructura de la pared celular, representación en la Figura 5 y 6. Las bacterias Gram positivas poseen una gruesa capa de peptidoglicano, con dos tipos de ácidos teicoicos: el ácido lipoteicoico (situado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática) y el ácido teicoico (que se halla en la superficie, anclado solamente en el peptidoglicano). Esto es diferente en las bacterias Gram negativas, es delgada la pared celular a comparación del otro grupo de bacterias, y está incorporada, mediante lipoproteínas, a otra membrana plasmática externa, dicha membrana es soluble en solventes orgánicos, además la capa de peptidoglucano es muy delgada y no retiene el complejo del tinte de cristal violeta, así que no es posible su tinción azul violácea (Madigan et al., 2009; Mollinedo & Gonzáles, 2014).

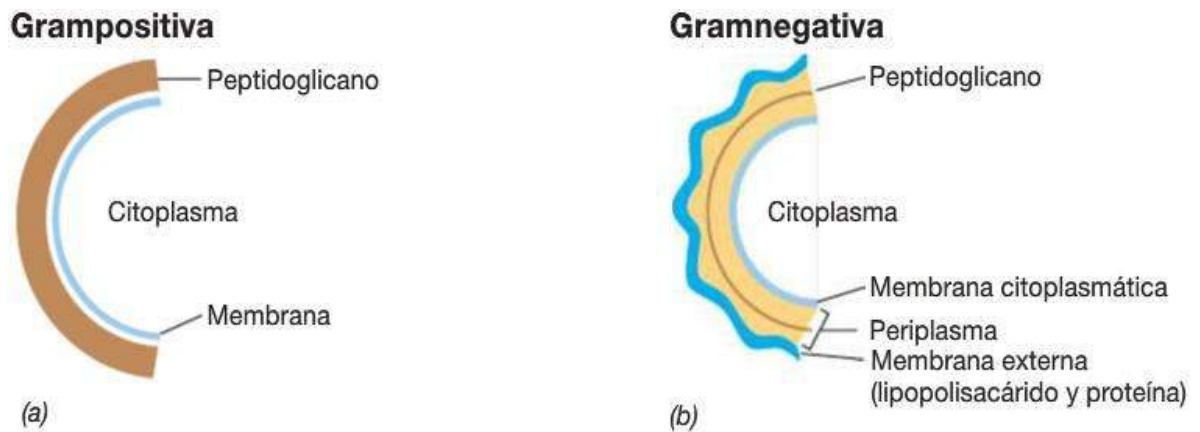


Figura 5. Diagramas esquemáticos de paredes celulares. (a) Pared celular grampositiva. (b) Pared celular gramnegativa.

Fuente: Madigan et al., 2009.

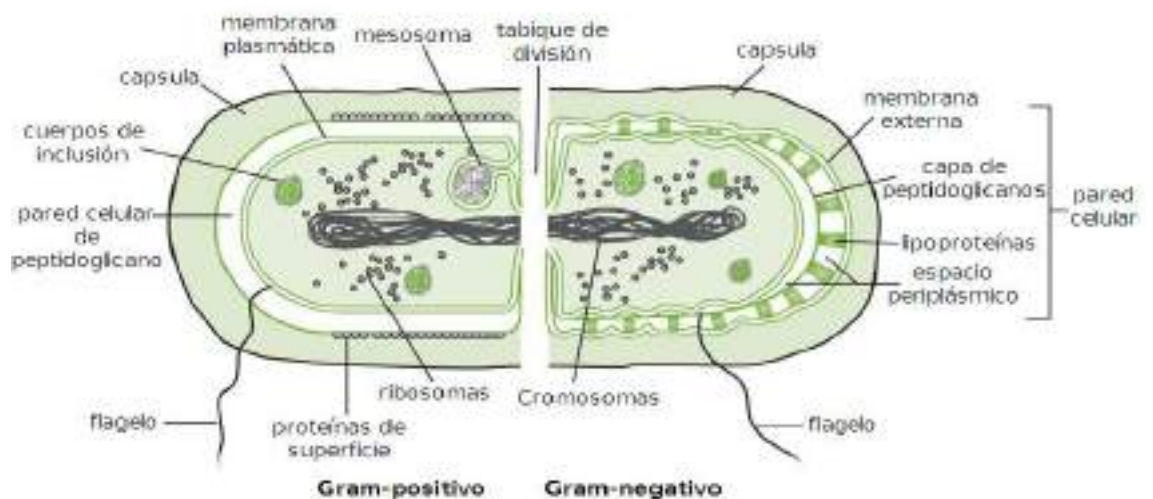


Figura 6. Estructura general de una célula procariota.

Fuente: Rosenthal & Tan, 2010.

1.2.6. *Pseudomonas*

Sobre el género *Pseudomonas*, Ruíz (2007, p. 3) refiere:

El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia Pseudomonadaceae, que se sitúa dentro del orden Pseudomonadales, que además comprende la familia Moraxellaceae.

La familia Pseudomonadaceae incluye el género *Xanthomonas*, que junto con *Pseudomonas*, forman el grupo conocido pseudomonadales; este grupo es, tradicionalmente, conocido por los microbiólogos como un grupo patógeno de plantas, más que animales.

Las *Pseudomonas* son bacilos rectos o ligeramente curvados que destaca cuyo grupo Gram negativos que no forman esporas y de tamaño variable de 0,5 a 1,0 μm por 1,5 a 5,0 μm . Poseen la capacidad de integrar, procesar, y reaccionar frente a las condiciones cambiantes del medio ambiente en donde se encuentra, además es uno de los microorganismos que sus requisitos nutricionales son muy simples (Lacal, 2008; Del Águila, 2010).

Las especies de *Pseudomonas* pueden encontrarse en distintos ambientes, en hábitats que contenga compuestos orgánicos simples o complejos, en condiciones aeróbicas, con rango de temperatura de 4 - 42 °C y un pH entre 4 - 8, a razón de su gran adaptabilidad genética y metabólica. Aunque puedan sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier ambiente, la mayoría de las especies optan su crecimiento entre los 30 – 37 °C, y con elevado contenido de sales entre un rango de temperatura comprendido de 20 °C – 42 °C (Ruíz, 2007).

Las especies del género *Pseudomonas* y los relacionados se encuentran en la taxonomía sobre la base de similitudes rRNA según su filogenia y a varias características fisiológicas (Palleroni, Kunisawa, Contopoulou y Doudoroff, 1973; Palleroni, 1984). Según la homología de ARNr fueron clasificados en cinco grupos. El primer grupo también designadas como *Pseudomonas* “verdaderas” conformados por el ARNr grupo I de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y especies relacionadas. El segundo conformado por el ARNr grupo de II están *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas mallei* y especies relacionadas (siendo reclasificados como *Burkholderia*), también las *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas picketti* y especies relacionadas (siendo

reclasificado como *Burkholderia* y, posteriormente, como *Ralstonia*). El tercero conformado por el ARNr grupo de III están las *Pseudomonas testosteroni* y especies relacionadas, siendo reclasificadas como *Comamonas*; también especies de *Pseudomonas acidovorans* y especies relacionadas, Siendo reclasificadas como *Comamonas*, y posteriormente, como *Delftia*; otras especies pertenecientes al grupo están las *Pseudomonas facilis* y especies relacionadas, siendo reclasificadas como *Acidovorax*; entre otras especies *Pseudomonas palleronii* y especies relacionadas, siendo reclasificadas como *Hydrogenophagas*; otras especies del grupo *Pseudomonas saccharophila*, hasta la fecha no fue reclasificada. El cuarto conformado por el ARNr grupo IV de *Pseudomonas tiny*, *Pseudomonas diminuta* y *Pseudomonas vesicularis*, siendo reclasificadas como *Brevundimonas*. El quinto está conformado por el ARNr grupo V de *Pseudomonas maltophilia*, siendo reclasificado como *Xanthomonas*, y posteriormente, como *Stenotrophomonas* (Woese et al., 1984; Moore et al., 2006).

Según Moore et al. (2006), se han reconocido 156 especies de *Pseudomonas* con nomenclatura de pie, sin embargo 48 especies de este género fueron reclasificado y ahora se consideran como basónimos o sinónimos de especies situadas en otros géneros. Las *Pseudomonas aureofaciens* y *Pseudomonas perfectomarina* son dos especies reconocidas sinónimos heterotróficos de las *Pseudomonas chlororaphis* y *Pseudomonas stutzeri*, respectivamente. Además 10 especies de *Pseudomonas* se reconocen como no pertenecientes al género, aunque todavía no han sido reclasificadas.

Se han descrito algunas cepas de *Pseudomonas* la capacidad de alcanzar a resistir la presencia de los metales pesados, los microorganismos inclinan a desarrollar mecanismos únicos para resistir el medio donde se encuentra o mecanismos de desintoxicación en respuesta a la toxicidad que la mayoría no toleran (Figura 7); también adquieren resistencia a otros compuestos como los disolventes orgánicos y detergentes, que indica una diversa variedad de fuentes de carbono como nutrientes,

y también que los ambientes y nichos sean difícilmente puedan ser colonizados por otros microorganismos (Lacal, 2008; Wasi, Tabrez & Ahmad, 2013).

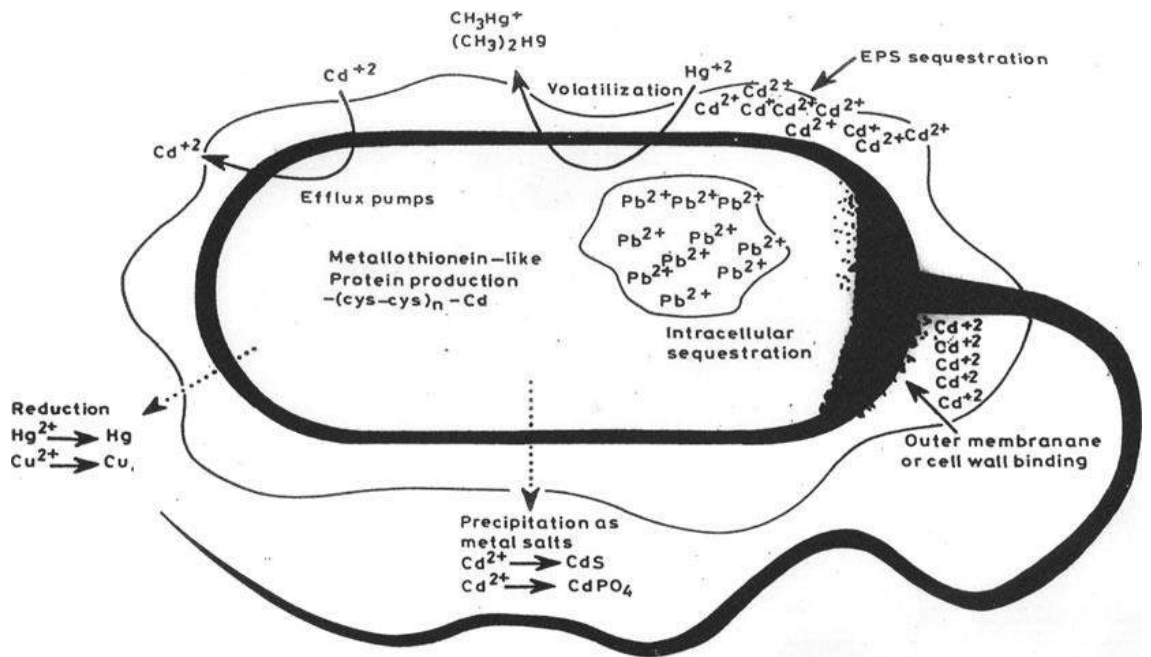


Figura 7. Mecanismo de interacción de *Pseudomonas* con los metales pesados
Fuente: Wasi et al., 2013.

La buena reputación del género se debe a los diversos números de artículos publicados, que resaltan la versatilidad y capacidad de estos microorganismos, para degradar diferentes compuestos orgánicos, como también de poseer una gran habilidad en metabolizar una amplia variedad de hidrocarburos aromáticos y alifáticos, además de la resistencia a desinfectantes, metales pesados, detergentes e incluso una resistencia a los antibióticos (Alanis & Guerrero, 2004; Ruíz, 2007).

1.2.6.1. *Pseudomonas putida*

La especie *Pseudomonas putida* es una bacteria saprofita del suelo, oportunista, cosmopolita, además que es muy versátil en su metabolismo por tener una dioxigenasa principal, también un tolueno dioxigenasa, a pesar de no contar con la dioxigenasa específica para los hidrocarburos aromáticos policíclico, estas características permiten que sea una buena candidata para las aplicaciones en la biotecnología (Daane et al., 2010, citados por López et al., 2006, p. 87).

Según Muñoz (2012), en 1971 el doctor Chakrabarty obtuvo la primera patente de un ser vivo, siendo la bacteria *Pseudomonas putida* genéticamente modificada con la capacidad para degradar algunos de los componentes del petróleo. En 1981 el comité de ADN recombinante de los Institutos de la Salud de EE. UU. certificó que la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 curada del plásmido TOL no es patógena para animales y plantas, y se puede considerar como un hospedador seguro en la clonación de genes de bacterias del suelo (Lacal, 2008).

Pseudomonas putida se aíslan con mucha más frecuencia en suelos templados, agua, particularmente lugares contaminados con químicos orgánicos y con otro tipo de agente xenobiótico. En los ecosistemas participan en un rol muy importante en el reciclaje de los residuos orgánicos en ambientes aeróbicos y microaerófilos que pueden utilizar más de 80 compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía, debido que la bacteria es nutricionalmente muy versátiles (Clarke, 1982, citado por Kahlon, 2016, p. 129; Timmis, 2002, citado por Kahlon, 2016, p. 129).

Tienen un gran potencial en la biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos de petróleo, disolventes químicos orgánicos, compuestos policíclicos y heterocíclicos, etc. La degradación de varios de estos compuestos, como el alcanfor, el ácido salicílico, el benceno, el tolueno, el xileno, el naftaleno, el ácido benzoico y sus derivados clorados, los bifenilos, la nicotina alcaloide, etc. de *Pseudomonas putida* están mediados por las rutas codificadas en plásmidos (Kahlon, 2016).

La especie *Pseudomonas putida* posee gran potencial metabólico y son de interés, ya que pueden obtener fuentes de carbono y energía, al degradar la variedad de alcanos de cadena larga alifáticos, compuestos aromáticos y

compuestos policíclicos. Como tales, se consideran importantes en la biorremediación del medio ambiente contaminado con contaminantes químicos peligrosos (Kahlon, 2016).

1.2.7. Resistencia y Tolerancia de las Bacterias a los Metales Pesados

Los metales pesados presentes en el ambiente fuerza a los microorganismos a una selección que permite el desarrollo de nuevas generaciones con capacidades de degradación y mecanismos para soportar la absorción de iones metálicos; por el propósito de soportar las condiciones de estrés y sobrevivir en condiciones desfavorables. La presencia de sustancias tóxicas afectan las actividades de las comunidades microbianas, influenciando la abundancia y diversidad (Spain, 2003; Panigatti, Torres, Griffa, Boglione & Gentinetta, 2007).

Las especies “Tolerantes” o “Resistentes” son llamadas así por comunidades microbianas con la capacidad de desarrollarse en áreas contaminados y persistir en esos ambientes. Existen diferencias entre microorganismos de especies tolerantes y resistentes. Las especies con capacidad de resistir a los contaminantes se caracterizan por tener mecanismos de detoxificación, establecido o incorporados por el metal; sin embargo, los tolerantes son indiferentes a la ausencia o presencia del metal en el ambiente que lo rodea (Panigatti et al., 2007; Beltrán & Gómez, 2015).

El mecanismo de resistencia de los microorganismos involucra el flujo de salida de iones de metales pesados hacia el exterior de la célula, la acumulación y la complejación de los iones metálicos dentro de la célula; también la disminución de la toxicidad mediante la reducción de los iones de metales pesados. La toxicidad del metal está relacionado a la biodisponibilidad, es cuya capacidad para transferir un elemento ambiental a los organismos vivos; dependerá de la concentración total del metal, los factores fisicoquímicos y factores biológicos tales como la biosorción, bioacumulación y solubilización (Spain, 2003; Beltran & Gómez, 2015).

1.2.8. Biorremediación

La biorremediación es aquella tecnología que usa agentes biológicos capaces de remover y desintegrar sustancias tóxicas o anticipar la contaminación mediante tratamiento de los desechos. Este proceso depende de los microorganismos que presentan propiedades catabólicas que integran o usan los contaminantes para su desarrollo, como fuente de carbono o energía (Panigatti et al., 2007; Beltrán & Gómez, 2015; Rodríguez et al., 2017).

Los microorganismos capaces de efectuar la biorremediación, por general pueden ser aislado de un área contaminada o de diferentes lugares, y ser introducido a un sitio contaminado para que realice la función de descontaminación. Los organismos vivos transforman los compuestos xenobióticos que producen reacciones dentro de sus procesos metabólicos (Vidali, 2001).

Los procesos de biorremediación son aplicados frecuentemente en la de reducción de contaminantes químicos de los suelos, aguas superficiales, aguas servidas domésticas e industriales, residuos de derivados de hidrocarburos por refinerías petroleras y entre otros. Existen industrias de fundición y minería que aplican microorganismos con la capacidad de realizar biosorción para reducir la contaminación emitidas o generadas por la obtención de los metales, el cual se puede usar la biomasa viva o muerta (Sandoval, 2006).

La biosorción es el proceso pasivo de la captación de metales que realiza una biomasa viva o muerta. Particularmente se caracteriza por la interacción fisicoquímica del metal con ligandos concerniente a la superficie de la célula (Figura 8). La interacción se genera debido a los grupos funcionales expuestos en el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas compuestas de las paredes celulares, entre ellos carboxilo, hidroxilo, fosfato, amino, sulfhídrico. Los procesos

que incluyen a la biosorción, son la bioabsorción y bioadsorción (Vullo, 2003; Covarrubias et al., 2015)

La biomasa sumergida en una solución acuosa tiene la propiedad de retener y concentrar los metales pesados, a ese proceso es denominado como bioabsorción. La superficie de los microorganismos posee componentes que actúan como bioabsorbentes, conformado de polímeros estructurales y extracelulares con un elevado contenido de grupos de polianiones, que se relacionan con los metales, reteniendo al elemento dentro de la estructura celular (Suarez & Reyes, 2002).

La bioadsorción es un proceso no metabolizado y no enzimático, consta en la afinidad de los iones metálicos hacia la pared celular, debido a composición y estructura. La adsorción se debe a unión no específica de la especie iónica a grupos funcionales de los polisacáridos y a las proteínas asociados a la célula o metabolitos excretados. Así que la captura de los metales es función rigurosamente de la composición química que cubre y protege del exterior a la célula (Sandoval, 2006; Bautista, 2008).

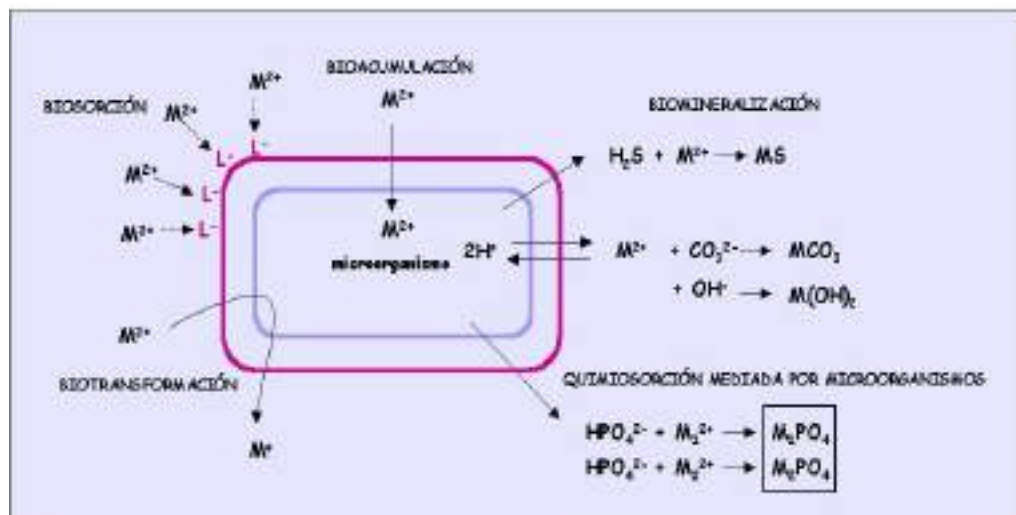


Figura 8. Mecanismo de interacción de los microorganismos con los metales.

Fuente: Vullo, 2003.

1.2.9. Inmovilización de Células

La inmovilización de las células es una técnica que es aplicable en distintos microorganismos y se puede usar diferentes materiales para lograrlo como la gelatina, gel de poliacrilamida, agar, alginato de calcio, quitosano, carragenina, alcohol polivinílico o sol-gel como materiales para la formación de la matriz y entre otros materiales (Jack & Zajic, 1977, citados por Martínez & García, 2012, p. 56).

El alginato de calcio es un material muy usado para la inmovilización de distintos tipos de microorganismos, ya que las condiciones requeridas para su elaboración son sencillas, sin reacciones extremas, a bajo costo y de baja toxicidad. Es considerado como un método promisorio para incrementar la degradación de compuestos xenobióticos, debido que las células atrapadas en el interior de la matriz están protegidas contra ambientes difíciles de sobrevivir; esto no sucede cuando las células son retenidas en la superficie de un soporte. Las células inmovilizadas en el interior de la matriz son fácilmente liberadas al medio por la disolución del gel en presencia de agentes quelantes del calcio, tales como citrato de sodio y fosfato de potasio (Mohammad & Bustard, 2008, citados por Martínez & García, 2012, p. 58).

La aplicación de inmovilización de microorganismos en el propósito para degradación de contaminantes, son dirigidos principalmente en estudios de medio acuosos, formando un microhábitat favorable y con protección dentro del material usado, además los microorganismos inducidos a este ambiente aprovechan una fuente temporal de sustrato específicos (Veen et al., 1997, citados por Martínez & García, 2012, p. 60).

Para la resistencia a la toxicidad a altas concentraciones de sustrato se inmoviliza los microorganismos. El uso de microorganismos inmovilizados en procesos de remoción de contaminantes consigue un aumento de la tasa global de biodegradación, ya que se alcanzan elevadas densidades celulares, incluso aumentó

la estabilidad y tolerancia a los agentes xenobióticos que puede causar daño a los microorganismos (Martínez & García, 2012).

Se denomina alginato a algunas sales del ácido algínico, un polisacárido aniónico lineal, encontradas en gran abundancia en especies de algas marinas, que llegan hasta 40 % de su peso. El alginato extraído de las paredes celulares de algas pardas de clase Phaeophyceae, principalmente de las especies *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *macrocystis pyrifera* (Avendaño, López & Palou, 2013); además algunas bacterias pueden producir el compuesto como la *Pseudomonas aeruginosa* y la *Azotobacter vinelandii*. Cuantiosas investigaciones físico-químicas han sido llevados a cabo referente al proceso de gelificación que involucra los mecanismos y características estructurales del material (Méndez, Quintero, Váquiro & Solanilla, 2014). Los iones polivalentes como el calcio incita la formación de asociación entre cadenas contiguas de ácido algínico, así que los autores Morris, Rees, Thom, y Boyd (1978) y Grant, Morris, Rees, Smith y Thom (1973), propusieron un modelo gráfico del área de unión que efectúa entre dichas cadenas, conocida como “eggs-box model”, traducido al español “modelo caja de huevos”, véase la Figura 9 (Méndez et al., 2014).

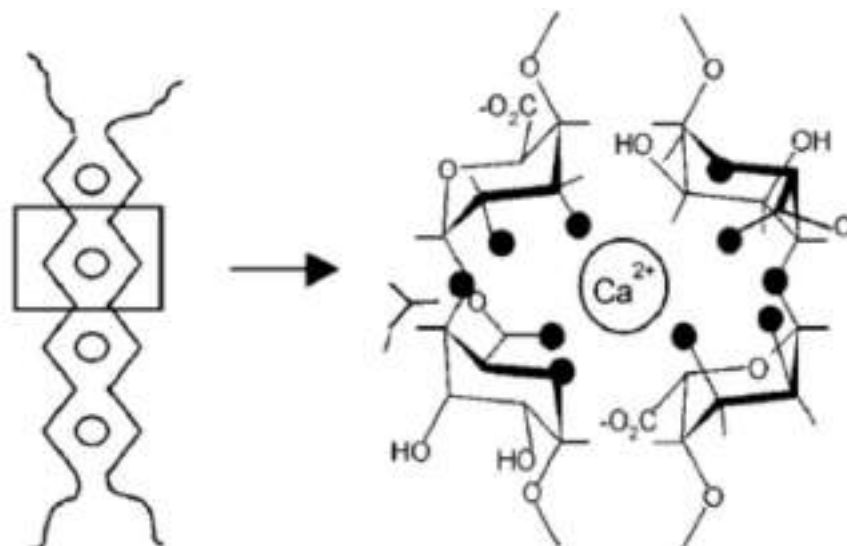


Figura 9. Iones polivalentes del calcio inducen asociación entre cadenas adyacentes de ácido algínico. Modelo de caja de Huevo propuesto por Morris et al. (1978) y Grant et al. (1973).

Según Méndez et al. (2014), refiere “el alginato está compuesto por bloques (copolímero) de ácido β -D-manurónico (M) y su epímero (C-5) ácido α -L-gulurónico (G), unidos por enlaces 1-4”. El alginato de sodio tiene una característica funcional peculiar en la formación de geles irreversibles e insolubles en agua después de la combinación de compuestos de ácido gulurónico por medio de las adherencias de los grupos carboxilo con los iones calcio, véase en la Figura 10.

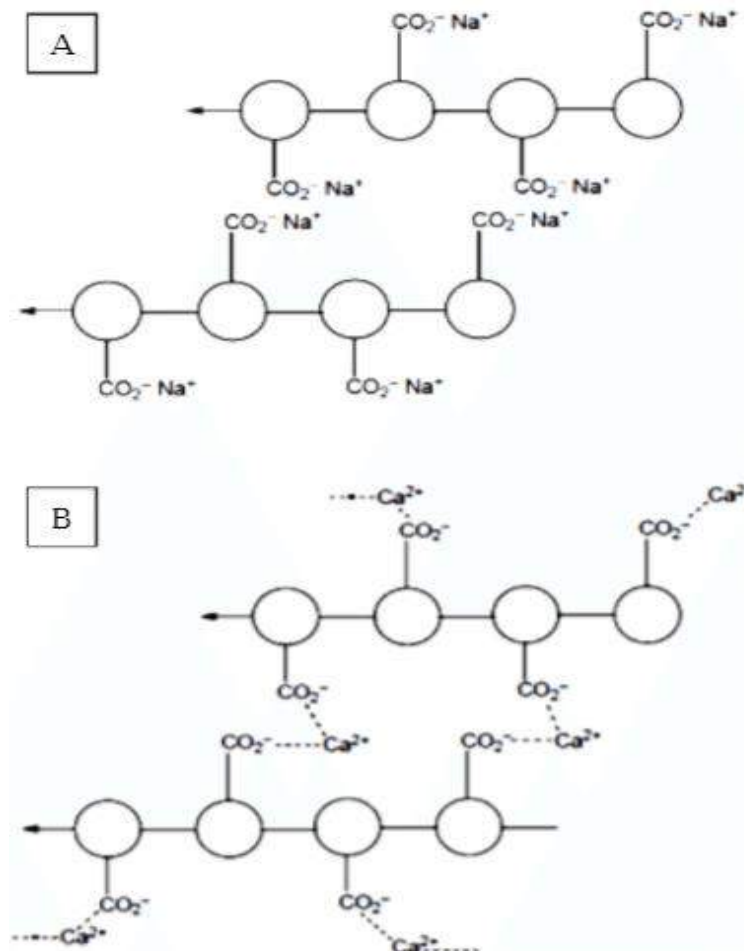


Figura 10. (A) Cadenas de alginato de sodio sin entrecruzamiento. (B) cadenas adyacentes de alginato de sodio entrecruzadas con iones calcio (entrecruzamiento de las cadenas poliméricas).

Fuente: Méndez et al., 2014.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. Lugar y fecha

La presente investigación se realizó en el laboratorio de la Universidad Católica Sedes Sapientiae (UCSS) sede ubicada en la calle Manuel Gonzáles Prada en el distrito de Los Olivos - Lima. El periodo de ejecución empezó desde el mes de marzo hasta su culminación en el mes de agosto del año 2017.

2.1.2. Descripción del experimento

El experimento contó con dos etapas que permitieron alcanzar los objetivos planteados en la presente investigación.

La primera etapa se evaluó la concentración (mg/L) de los metales pesados de Pb y Cd presentes en las muestras de agua del río Pativilca, usando la cepa de *Pseudomonas putida* ATCC 49128. Para esto se activó la cepa bacteriana en Agar King B y se cultivó a una temperatura de 35 °C. A partir de ello se realizaron las actividades de conteo de colonias con el método del número más probable, y se elaboró la curva de crecimiento poblacional de la bacteria. Las bacterias tuvieron que ser adaptadas a diferentes concentraciones de los metales cadmio y plomo, por lo que se adicionó al caldo nutritivo de tripticasa de soya la cantidad de 0,01 mg/ml de $Pb(NO_3)_2$ y $Cd(SO_4)$ y se incubaron a temperatura de 35°C por 5 días.

La segunda etapa se realizó la adaptación de la cepa bacteriana, donde se llevó a cabo la inmovilización de la *P. putida* ATCC 49128 en perlas de alginato de calcio,

y luego usadas en los tratamientos. En la última etapa del proyecto, las *P. putida* ATCC 49128 fueron colocadas en cada recipiente que contenía 100ml de agua de la muestra del río y 100 ml de agua des-ionizada en el control.

2.1.2.1. Activación de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128

Para la presente investigación se adquirieron cepas *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en paquetes herméticos cuyo contenido fue de asas de culti loops; procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC) se mantuvo a la temperatura de 2 - 4 C° hasta su utilización correspondiente.

Se empleó el medio de cultivo agar Base *Pseudomonas* para activar la cepa, el cual se preparó bajo condiciones asépticas de esterilización en un autoclave (15 libras de presión, durante 20 minutos), se utilizó 30 g de agar y 10 ml de glicerol para un litro, se llevó a calentar la solución y fue puesto en matraz, luego se esterilizó la solución, posteriormente se realizó el plaqueo. Se usó un nuevo paquete de culti-loops de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128 y se procedió a inocular las placas, luego fueron rotuladas las placas inoculadas, y colocadas en la incubadora durante 24 horas a 35 °C, en condiciones aeróbicas para el crecimiento poblacional de las bacterias. Además, se realizó observaciones de la cepa en el microscopio mediante la tinción de Gram, véase el diagrama de flujo en la Figura 11 (Aquiahuatl, 2012).

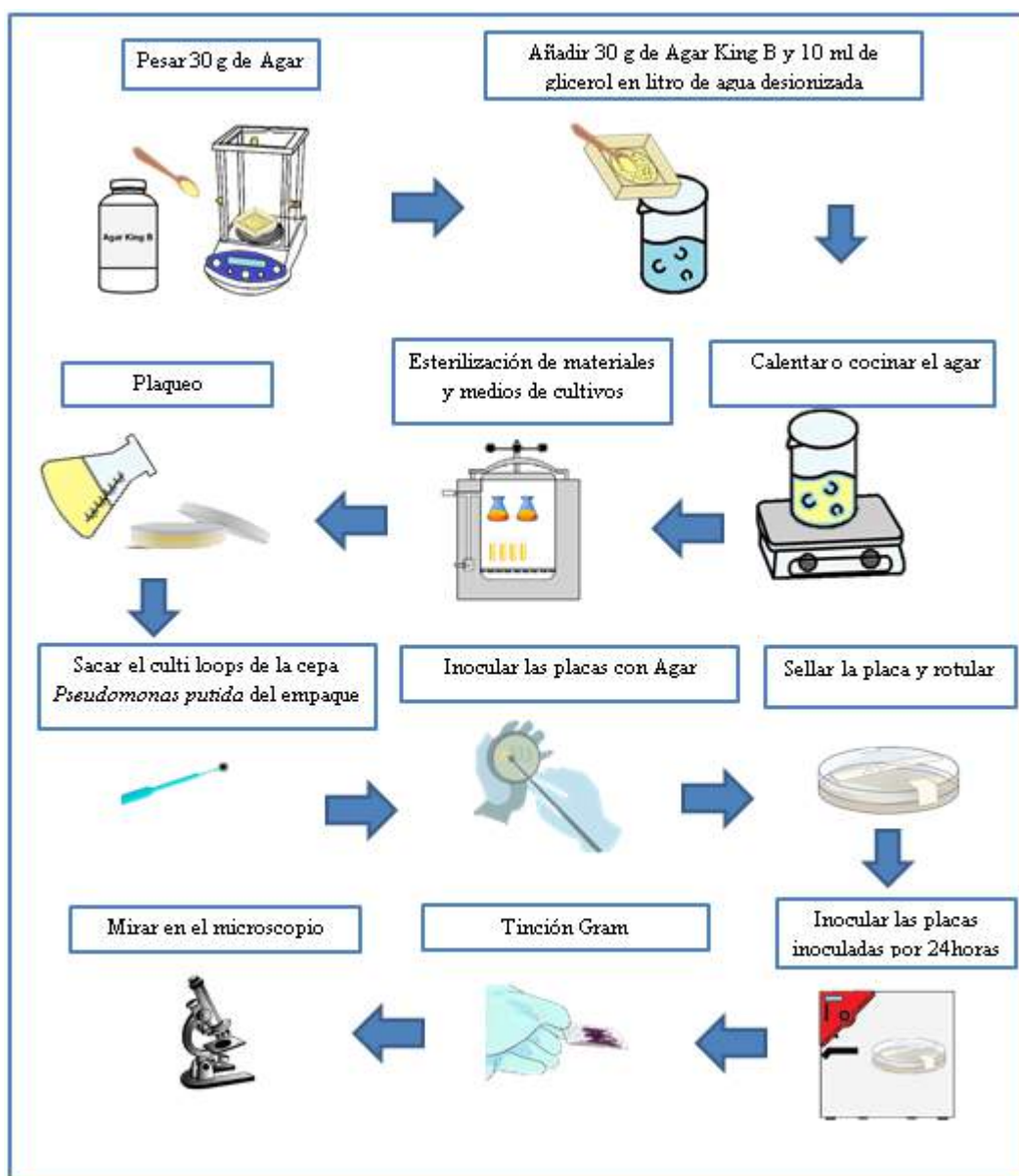


Figura 11. Diagrama de flujo del proceso de la activación de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128.

Fuente: elaboración propia.

2.1.2.2. Adaptación y selección de colonias de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 resistentes a altas concentraciones de plomo y cadmio

Para la adaptación de la cepa bacteriana se preparó un medio de cultivo con 30 g de caldo tripticasa de soya en 1 litro de agua desionizada; posteriormente se prepararon cinco soluciones a distintas concentraciones de plomo y cadmio en la forma de $Pb(NO_3)_2$ y $Cd(SO_4)$. La concentración inicial de ambos metales

utilizada en el presente estudio fue de 0,1 mg/ml y a partir de estas se preparó concentraciones de 10 % (0,01 mg/ml), 25 % (0,025 mg/ml), 50 % (0,050 mg/ml), 75 % (0,075 mg/ml) y 100 % (0,1 mg/ml). Las soluciones fueron esterilizadas en autoclave (15 libras de presión, durante 15 minutos), junto a otros materiales para la inoculación. Las *Pseudomonas putida* ATCC 49128 fueron inoculadas sobre el medio caldo tripticasa de soya con las diferentes concentraciones (Rathnayake, Megharaj, Krishnamurti, Bolan, & Naidu, 2013). Como control se utilizó la *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inoculada en medio caldo tripticasa de soya sin $Pb(NO_3)_2$ y sin $Cd(SO_4)$, véase en la Figura 12 el diagrama de flujo (Pérez, Barraza y Martínez, 2015).

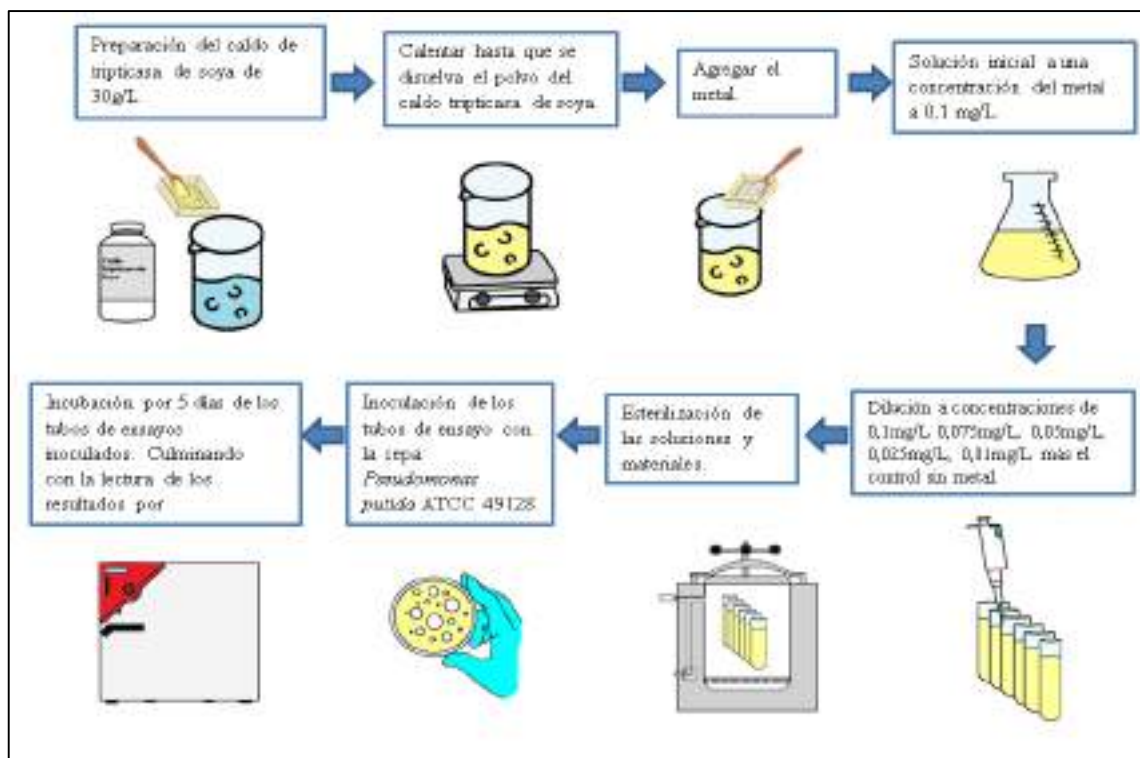


Figura 12. Diagrama de flujo de la adaptación de las *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en metales.

Fuente: elaboración propia.

2.1.2.3. Toma de Muestra

Las muestras fueron colectadas del río Pativilca ubicado en el distrito de Pativilca de la provincia de Barranca, el 17 de febrero de 2017, en las coordenadas UTM-WGS84 8812516,00 N – 194895,00 E, aproximadamente a

500 metros de la desembocadura al océano pacífico (Figura 13); punto de muestreo está establecido por la Autoridad Nacional del Agua (2014), como lo indica en el mapa del Apéndice 32.

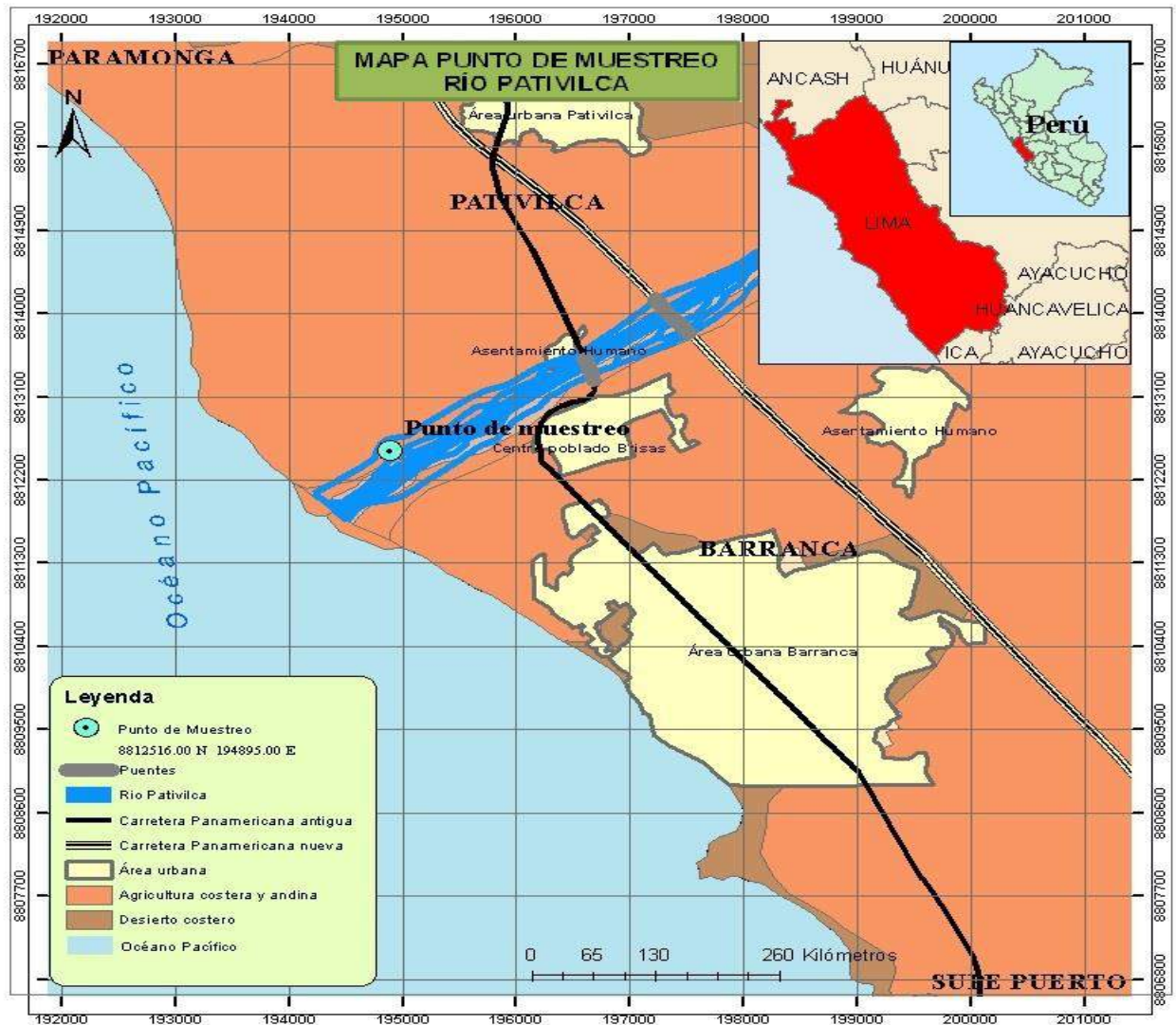


Figura 13. Ubicación de la toma de muestra en el río Pativilca.

Fuente: elaboración propia.

2.1.2.4. Preparación de las Muestras de Aguas Extraídas del Afluente del Río Pativilca

Las muestras colectadas del río Pativilca fueron filtradas 2 veces con papel filtro (Rundfilter 125 mm) para asegurar la completa remoción de partículas en suspensión, esterilizados en autoclave en matraces Erlenmeyer de 300 ml para

evitar el crecimiento de algún microorganismo presente y luego guardados a 4 °C hasta su uso (Aquiahuatl, 2012).

2.1.2.5. Caracterización Físico-química de las Muestras de Agua Extraída del Afluente del Río Pativilca-Lima

Se realizó un análisis inicial de los parámetros físico-químicos de las muestras de agua del afluente del río Pativilca y esterilizadas. Cuyos parámetros físico-químicos medidos fueron: pH, conductividad, nitrógeno total, fósforo, plomo y cadmio, y la metodología se encuentran detallados en la Tabla 1.

2.1.2.6. Inmovilización de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 con Alginato de Calcio

A partir de los cultivos que resistieron a concentraciones altas de Pb y Cd, se transfirieron con un asa de siembra de las placas a caldo tripticasa de soya e incubadas a 33 °C – 35 °C. Una vez alcanzada la fase exponencial en los cultivos, fueron tomadas 2 g de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 extraída y mezclados con 60 ml de una solución de alginato de sodio al 4 % previamente esterilizado en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión y por 20 minutos. En este punto, se procedió a realizar esta misma dilución con aguas destilada para el conteo de las bacterias con el fin de determinar la concentración celular en esta nueva solución. Con una jeringa de 10 ml, se tomó el preparado del alginato de sodio con la bacteria y se dejó caer gotas a una solución estéril de cloruro de calcio a 0,05 M, agitando lentamente para conseguir las esferas. Luego las cápsulas se dejó reposar en el cloruro de calcio durante 1 hora aproximadamente, véase el diagrama de flujo de la Figura 14 (Chitiva & Dussán, 2003).

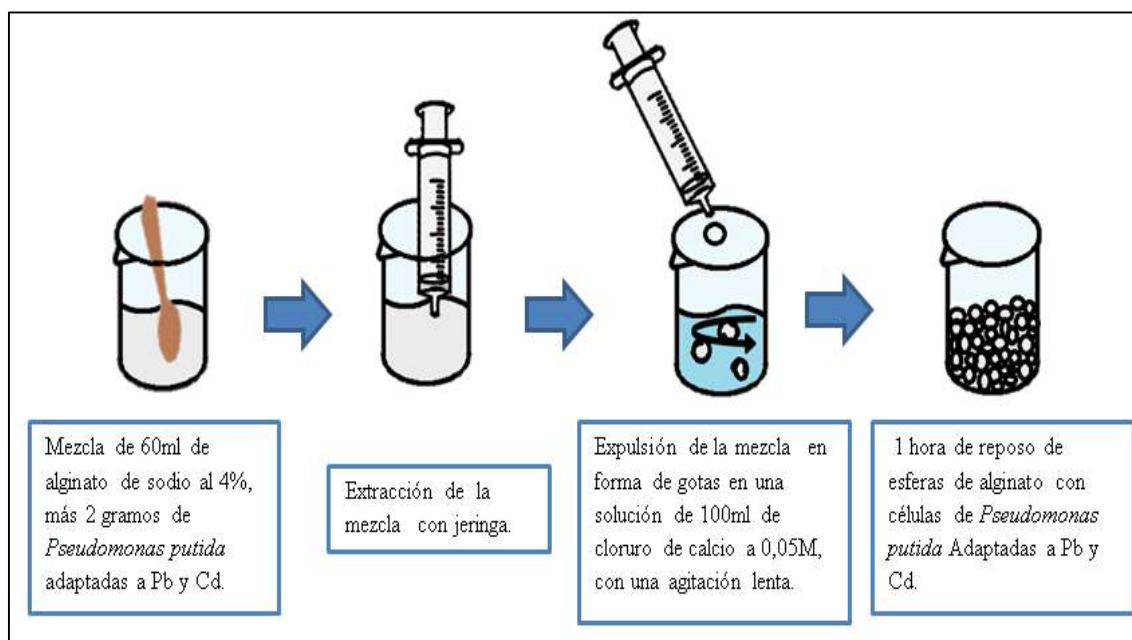


Figura 14. Diagrama de flujo de la elaboración de perlas de alginato de calcio con células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128.

Fuente: elaboración propia.

2.1.2.7. Evaluación de la Capacidad de Remoción de Plomo y Cadmio por la Cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128 Aplicada en las Muestras de Agua Extraído del Afluente del Río Pativilca

Para la absorción se añadieron perlas con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 (2 g) a 100 ml de agua extraído del afluente del río Pativilca conteniendo Pb o Cd y se mezcló a temperatura ambiente. Las muestras se retiraron después de culminar el tiempo de 0, 6, 12, 18, 24 horas (Azoddein, Yunus, Sulaiman, Bustary & Azli, 2015).

Se obtendrá el porcentaje de remoción Q %:

$$Q(\%) = \left(\frac{C_0 - C_t}{C_0} \right) \times 100$$

Donde C_0 (mg/L) es la concentración inicial, C_t (mg/L) es la concentración en un tiempo final (Leyva, Sánchez, Hernández & Guerrero, 2001).

2.1.2.8. Cinética de Crecimiento

La cinética de crecimiento celular de la cepa de la bacteria *Pseudomonas putida* ATCC 49128 se calculó mediante el conteo de colonias en placas con agar King B con el método de más probable en 24 horas. La tasa de crecimiento específico (μ), se expresa de la siguiente forma:

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$$

Donde X_t es el número de células después de un tiempo, X_0 es el número inicial de células, t es el tiempo transcurrido.

El número de generaciones de las células (n), se expresa la ecuación de la siguiente forma:

$$n = 3,3 \ln \frac{X_t}{X_0}$$

Tiempo de generación (g) se define como el tiempo requerido para la formación de dos células a partir de un tiempo de duplicación, la ecuación se expresa de la siguiente forma:

$$g = \frac{t}{n}$$

Constante de velocidad de crecimiento (k) es la medida del número de generación que ocurre por unidad de tiempo en una cultura de crecimiento exponencial, la ecuación se expresa de la siguiente forma:

$$k = \frac{\ln 2}{g}$$

2.1.2.9. Evaluación de Parámetros Físico-químico Durante la Aplicación de las Perlas de Alginato de Calcio con Células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 a las Muestras de Agua Extraídas del Afluente del Río Pativilca

El propósito de esta evaluación es adquirir información de los cambios físico-químicos que van desarrollándose, en tiempo ya establecido en la Tabla 1, después de haber colocado o sometido las perlas de alginato con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 a las muestras de agua del río Pativilca.

Se evaluaron los siguientes parámetros físico-químicos:

a) Determinación de pH

Para la medición del pH se usará el pH-metro o potenciómetro de laboratorio debidamente calibrado.

b) Determinación de plomo (Pb)

Para el análisis de remoción de plomo (Pb), el análisis se hizo por la técnica de fotometría con el equipo WTW pHotoFlex ® y se comparó los resultados con los estándares nacionales.

c) Determinación de cadmio (Cd)

Para el análisis de remoción de cadmio (Cd), el análisis se hizo por la técnica de fotometría con el equipo WTW pHotoFlex ® y se comparó los resultados con los estándares nacionales.

d) Determinación de fósforo Total (P)

El análisis de fósforo total (P) se efectuó mediante la técnica de fotometría con el equipo WTW pHotoFlex ®.

e) Determinación de nitrógeno total (N)

El análisis de nitrógeno total (N) se efectuó mediante la técnica de fotometría con el equipo WTW pHotoFlex ®.

f) Medición de conductividad

La medición de conductividad se efectuó mediante el uso de conductímetro del laboratorio.

Tabla 1

Mensuración de parámetros físicos-químicos

Parámetros	Unidades	Metodología empleada
pH	Unidades de pH	pH-metro Potenciometría
Conductividad	µS/cm	Conductimetría
Nitrógeno	mg/L	Fotometría
Fósforo	mg/L	Fotometría
Cadmio	mg/L	Fotometría
Plomo	mg/L	Fotometría

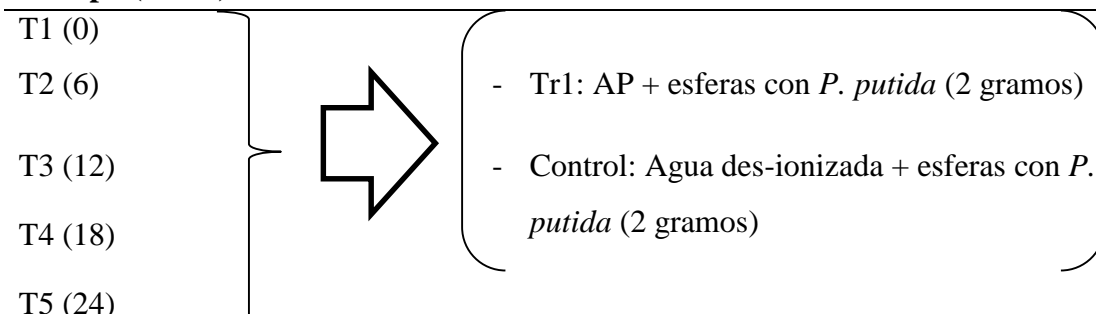
Fuente: elaboración propia.

2.1.3. Tratamientos

El tratamiento (Tr1) consistió en agregar 2,0 gramos de esferas de perlas de alginato de calcio con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 sometidas las muestras de agua extraído del río de Pativilca a diferentes tiempos. El control consistió en agregar 2,0 gramos de esferas de perlas de alginato de calcio con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 sometidas al agua des-ionizada a los mismos tiempos establecidos en el tratamiento (Tr1). Donde se evaluó los parámetros físicos-químicos (Tabla 1) del agua del Tr1 y el control en los de tiempos de 0, 6, 12, 18, 24 horas.

Tabla 2

Tiempo y tratamiento considerados en la investigación (T: tiempo; Tr1: tratamiento 1; AP: agua del afluyente del río Pativilca conteniendo Pb o Cd)

Tiempo (horas)	Tratamiento
T1 (0)	 <ul style="list-style-type: none"> - Tr1: AP + esferas con <i>P. putida</i> (2 gramos) - Control: Agua des-ionizada + esferas con <i>P. putida</i> (2 gramos)
T2 (6)	
T3 (12)	
T4 (18)	
T5 (24)	

Fuente: Elaboración propia.

2.1.4. Unidades Experimentales

Las unidades experimentales en la investigación estuvieron conformadas por frascos de vidrio de capacidad de 120 ml, que contenía de agua del afluyente del río Pativilca, más las perlas de alginato de calcio con células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizadas y adaptadas. En el control estuvo conformado por agua destilada por 100 ml, más 2,0 g de perlas de alginato de calcio con células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas.

2.1.5. Diseño Estadístico del experimento

La presente investigación para la remoción de Pb y Cd presente en el agua del río Pativilca, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). Se constituyeron por 20 unidades experimentales incluido el control, para la medición de los parámetros físico-químico en 5 tiempos distintos.

2.1.6. Análisis Estadístico

En la presente investigación los datos obtenidos fueron procesados en el programa Microsoft Excel para la elaboración de tablas y gráficos, la cual permitió analizar la correlación de los parámetros.

Se usó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evaluar la actividad de la remoción de plomo y cadmio por *Pseudomonas putida* ATCC 49128 sometidas a los diferentes tiempos. Posteriormente los resultados estadísticamente significativos se analizaron mediante la prueba de Tukey. Se consideró como valor de significancia, el valor de $p < 0,05$, siendo usado el software SPSS.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS

3.1.1. Características Físico-químicos Iniciales de las Muestras de Agua Extraídas del Afluente del Río Pativilca

En la Tabla 3 se muestran los resultados de los análisis físico-químico evaluadas por triplicado a las muestras del agua extraídas del río Pativilca.

Tabla 3

Promedio de los resultados de los análisis físico-químico de la muestra de agua del afluente del río Pativilca (promedio \pm desviación estándar)

Parámetros	Unidades	Resultado
Nitrógeno total	mg/L	0,10 \pm 0,0055
Fósforo	mg/L	0,03 \pm 0,005
Plomo	mg/L	2,77 \pm 0
Cadmio	mg/L	1,60 \pm 0
Conductividad	μ s/cm	1300 \pm 0
pH	Unidad de pH	7,51 \pm 0,0141

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados de los parámetros físicos-químicos iniciales de la muestra de agua del río muestran que el nitrógeno total tuvo un valor estimado de 0,10 \pm 0,0055 mg/L, mientras que, para el caso del fósforo total, se encontró un valor promedio de 0,03 \pm 0,005 mg/L, siendo este valor menor a lo registrado en los estándares de calidad de agua. La conductividad se encontró a un valor promedio de 1300 \pm 0 μ s/cm. Asimismo, el pH presentó un valor promedio de 7,51 \pm 0,0141. Por otro lado, el análisis de los metales: plomo y cadmio, encontrados en el río Pativilca determinó los valores promedios de 2,77 \pm 0 mg/L y 1,66 \pm 0 mg/L respectivamente, superando

los estándares de calidad de agua (decreto supremo 004-2017 Ministerio del Ambiente).

3.1.2. Crecimiento Bacteriano de la Cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128

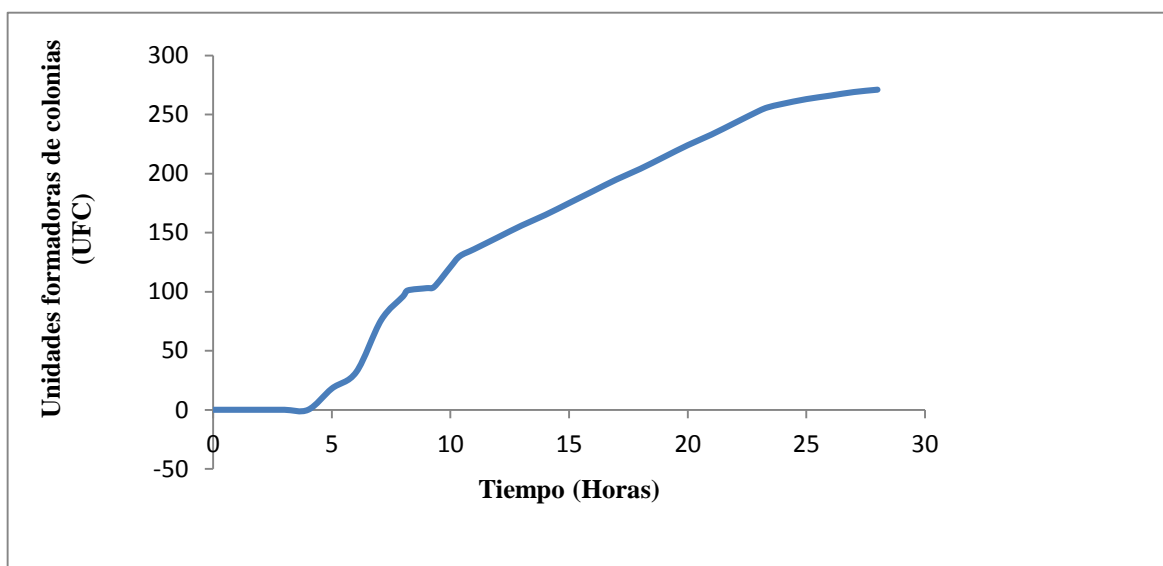


Figura 15. Curva de crecimiento de la *Pseudomonas putida* ATCC 49128.

El resultado del crecimiento bacteriano de la *Pseudomonas putida* ATCC 49128 evaluado durante 26 horas, evidenció una tendencia exponencial que inicia a las 8 horas con 96 UFC/ml, gráficamente se tomaron los puntos de la curva que se observan en la Figura 15 y a partir de estos se obtuvieron los parámetros de la cinética de crecimiento durante la fase exponencial, que se muestran en la Tabla 4.

La especie mostró una tasa de crecimiento específico (μ) de $0,14 \text{ horas}^{-1}$ con una constante de velocidad de crecimiento (k) de $4,993 \text{ horas}^{-1}$, la cual indica el tiempo que logro la duplicación poblacional. El tiempo de generaciones (g) fue de $2,159 \text{ horas}^{-1}$, lo que indica el tiempo que se produce una generación de la especie. El número de generaciones de las células (n) producidas en el tiempo durante el crecimiento poblacional, se obtuvo 8,799 generaciones.

Tabla 4

Parámetros cinéticos de crecimiento bacteriano

Parámetros cinéticos de crecimiento	Resultados
μ (horas ⁻¹)	0,14
k (horas)	4,939
Densidad celular máx. (UFC/ml)	266 x 10 ⁶
Tiempo de generación (horas)	2,159
Número de generación	8,799

Fuente: Elaboración propia.

3.1.3. Adaptación y Selección de Colonias de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 Resistentes a Altas Concentraciones de Plomo y Cadmio

3.1.3.1. Adaptación en Nitrato de Plomo

En la adaptación de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128 al plomo, se seleccionaron los cultivos que presentaron mayor turbidez (unidades nefelométricas) en respuesta al nitrato de plomo, como se muestra en la Tabla 5. El cultivo que presentó mayor UNT se inmovilizó en perlas de alginato de calcio y posteriormente aplicó para la remoción de plomo presente en el agua del río Pativilca.

Las concentraciones poblacionales más bajas de la cepa de *Pseudomonas putida* ATCC 49128, fueron las muestras que contenían 50 %, 75 % y 100 % de nitrato de plomo, con un valor de turbidez de 212,67 UNT, 192,33 UNT y 211,33 UNT respectivamente. Mientras que las mayores concentraciones poblacionales fue de las muestras que contenían 10 % y 25% de nitrato de plomo, con los valores de 375,33 UNT y 306 UNT respectivamente.

Tabla 5

Resultados en la adaptación de la cepa Pseudomonas putida ATCC 49128 en el medio con diferentes concentraciones de nitrato de plomo (Pb (NO₃)₂) (promedio ± desviación estándar)

Muestras	Nitrato de plomo (mg/ml)	Concentración (%)	Unidades nefelométricas (UNT)
1	0	0	200±2,6458
2	0,01	10	374,33±3,0551
3	0,025	25	306±3
4	0,050	50	212,67±1,5470
5	0,075	75	192,33±1,5275
6	0,1	100	211,33±1,5275

Fuente: Elaboración propia.

Las muestras con contenido de nitrato de plomo generaron el decaimiento de las concentraciones poblacionales de la *Pseudomonas putida* ATCC 49128, a medida que el porcentaje de concentración del dicho elemento fue aumentando, el cual fue la muestra 5 la concentración más baja de un valor promedio de 192,33 UNT, como se observa en la Tabla 5. En la muestra 1, a pesar que células de la cepa de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 estaba en un medio con una presencia nula de nitrato plomo, mostró una baja concentración población al igual que las concentraciones al 50%, 75% y 100%. En la muestra 2, presentó mayor concentración en crecimiento poblacional, por lo tanto, fue seleccionada para la inmovilización en alginato de calcio.

3.1.3.2. Adaptación en Sulfato de Cadmio

En la adaptación de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128 al cadmio, se seleccionaron los cultivos que presentaron mayor turbidez (unidades nefelométricas) en respuesta al sulfato de cadmio, como se muestra en la Tabla 6. El cultivo que presentó mayor UNT se inmovilizó en perlas de alginato de calcio y posteriormente aplicó para la remoción de plomo presente en el agua del río Pativilca.

Las muestras con contenido de sulfato de cadmio generaron un declive en las concentraciones poblacionales de la *Pseudomonas putida* ATCC 49128, a medida que el porcentaje de concentración del dicho elemento fue aumentando, el cual la mayor concentración poblacional de células de la cepa de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 se obtuvo de las muestras 2, 3 y 4 a un valor promedio de 736,67 UNT, 721,67 UNT y 385 UNT respectivamente. Las concentraciones poblacionales más bajas fueron las muestras 1, 5 y 6 a un valor promedio de 205 UNT, 206,33 UNT, 208,33 UNT respectivamente.

Tabla 6

Resultados en la adaptación de la cepa Pseudomonas putida ATCC 49128 en el medio con diferentes concentraciones de sulfato de cadmio (Cd(SO₄)) (promedio ± desviación estándar)

Muestra	Sulfato de cadmio (mg/ml)	Concentración (%)	UNT
1	0	0	205±3
2	0,01	10	736,67±4,93288
3	0,025	25	721,67±4,5092
4	0,050	50	385±1,7321
5	0,075	75	206,33±2,0817
6	0,1	100	208,33±2,5166

Fuente: Elaboración propia.

3.1.4. Selección de las células de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas a los metales de cadmio y plomo

En la Selección de las células adaptadas se optó por la muestra 2 de cadmio y plomo que fueron mezcladas con alginato de calcio para la aplicación de la experimentación (los tratamientos se detallan en la Tabla 2); la razón por usar la muestra 2 es debido que las células se adaptaron mucho mejor, presentando la mayor densidad poblacional a comparación de las otras muestras en la prueba de densidad óptica. Sé realizó el conteo de las unidades formadores de colonias de células adaptadas de cadmio y plomo en placas Petri, dando como resultado 252×10^6 UCF/ml.

3.1.5. Variación de la Concentración de Nitrógeno Total en las Muestras de Agua Extraídas del Afluyente del Río Pativilca

En la Tabla 7 se observa los valores de la variación de nitrógeno total presentes en las muestras de agua extraída del río Pativilca con las perlas de alginato de calcio con células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas y sometidas a distintos tiempos, obteniendo como resultado un valor promedio inicial de $0,10 \pm 0,0055$ mg/L y un valor promedio final de $0,42 \pm 0,0650$ mg/L.

La evaluación de nitrógeno total en el tiempo 1 (T1) obtuvo como resultado un valor promedio de $0,10 \pm 0,0055$ mg/L de nitrógeno total, siendo este valor el más bajo del experimento ($p < 0,05$). En el tiempo 2 (T2) a las 6 horas a presentando un valor promedio de $0,69 \pm 0,01483$ mg/L, el cual refleja un aumento respecto al valor inicial ($p < 0,05$). En el tiempo 3 (T3) a las 12 horas a presentado un valor promedio de $1,03 \pm 0,01517$ mg/L, el cual refleja un aumento respecto al valor anterior ($p < 0,05$). El tiempo (T4) a las 18 horas a presentado un valor promedio de $2,12 \pm 0,0683$ mg/L, el cual reflejó el valor más alto en las unidades experimentales de agua del río Pativilca ($p < 0,05$); y por último, el tiempo 5 (T5) a las 24 horas reflejó un valor promedio de $0,42 \pm 0,0650$ mg/L, teniendo un declive en el valor ($p < 0,05$).

Tabla 7

Análisis de variación del nitrógeno total (promedio \pm desviación estándar)

Tiempo \ Réplicas	Tiempo				
	T1	T2	T3	T4	T5
R1	0,11	0,69	1,05	2,16	0,32
R2	0,1	0,67	1,02	2,01	0,5
R3	0,1	0,71	1,03	2,19	0,41
R4	0,11	0,7	1,01	2,12	0,41
Promedio	0,1	0,69	1,03	2,12	0,42
Varianza	0,10 \pm 0,0055	0,69 \pm 0,01483	1,03 \pm 0,01517	2,12 \pm 0,0683	0,42 \pm 0,0650
Control	0,00 \pm 0	0,10 \pm 0,0084	1,57 \pm 0,0286	2,54 \pm 0,0451	0,68 \pm 0,0228

Fuente: Elaboración propia.

Se observa el control de los valores de nitrógeno total presentes del agua desionizada con las perlas de alginato de calcio con células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 sometidas a distintos tiempos, con un valor promedio inicial de 0,00 \pm 0 mg/L y una concentración promedio final de 0,42 \pm 0,0650 mg/L.

La Evaluación del nitrógeno total del control en el tiempo 1 (T1) obtuvo un resultado de un valor promedio de 0,00 \pm 0 mg/L de nitrógeno total. El tiempo 2 (T2) a las 6 horas a presentado el valor promedio de 0,10 \pm 0,0055 mg/L, el cual refleja un aumento respecto al valor inicial. El tiempo 3 (T3) a las 12 horas a presentado un valor promedio de 1,57 \pm 0,0286 mg/L, el cual refleja un aumento respecto al valor anterior. Se analizó el tiempo 4 (T4) a las 18 horas a presentado un valor promedio de 2,12 \pm 0,0683 mg/L, siendo el valor más alto en las unidades experimentales de control; y por último, el tiempo 5 (T5) a las 24 horas a presentado un valor promedio de 0,42 \pm 0,0650 mg/L, teniendo un declive en el valor.

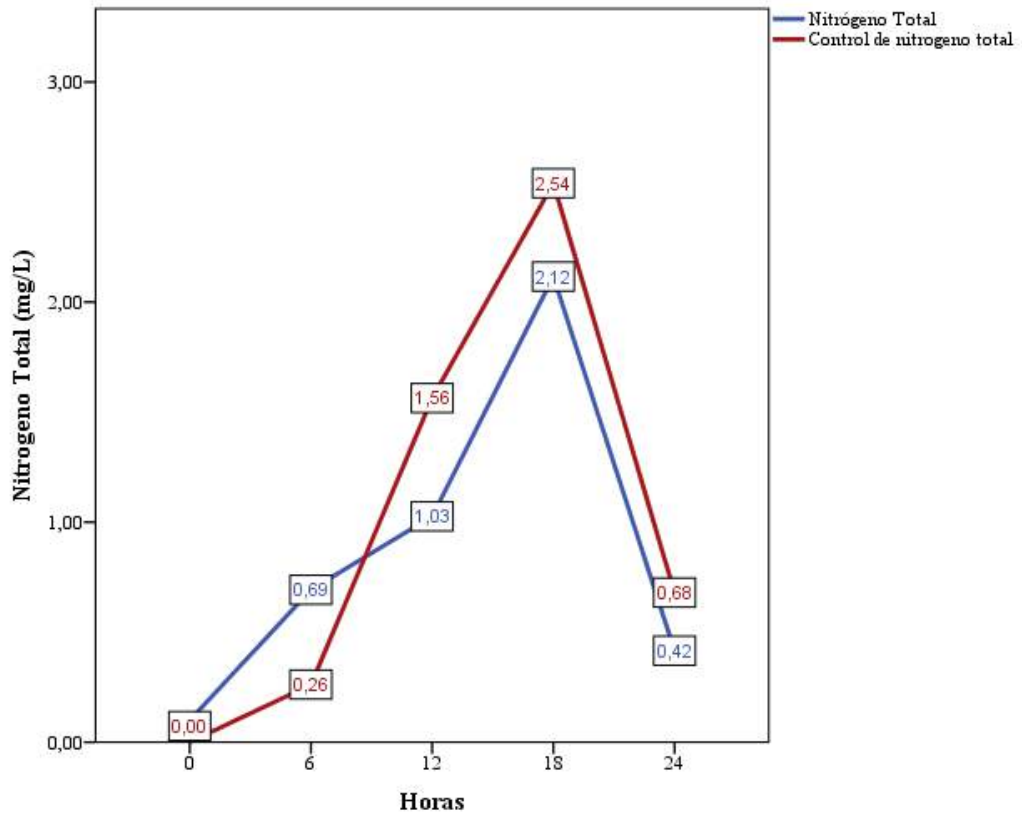


Figura 16. Variación de nitrógeno total y el control.

En la Figura 16, se muestra que los dos primeros tiempos los valores en el control son inferiores que los valores de las unidades experimentales con agua del río, sin embargo, los valores en el control de T3, T4, T5 resultaron ser mayores que con el agua del río. Tanto como en las unidades experimentales del agua del río y el control ambos en los tiempos de T1 hasta T4 presentan un incremento de los valores de concentración; también presenta un descenso de la concentración en los tiempos de T4 a T5 de las unidades experimentales de agua de río y el control.

3.1.6. Variación de la Concentración de Fósforo Total en las Muestras de Agua Extraídas del Afluente del Río Pativilca

En la Tabla 8, se observa los valores de la variación de fósforo total presentes en las muestras de agua extraída del afluente del río Pativilca con las perlas de alginato con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas y sometidas a distintos tiempos, obteniendo un valor promedio inicial de $0,03 \pm 0,005$ mg/L de fósforo total y un valor promedio final de $0,23 \pm 0,0096$ mg/L de fósforo total.

La evaluación del fósforo total en el tiempo 1 (T1) obtuvo un resultado a un valor promedio de $0,03 \pm 0,005$ mg/L de fósforo total ($p > 0,05$), siendo el valor más bajo de las unidades experimentales con agua de río Pativilca; se analizó el tiempo 2 (T2) a las 6 horas a presentado un valor promedio de $0,25 \pm 0,033$ mg/L ($p > 0,05$), el cual muestra un aumento respecto al valor inicial. En el tiempo 3 (T3) a las 12 horas a presentado a un valor promedio de $0,45 \pm 0,0618$ mg/L ($p > 0,05$), que mostró un incremento de la concentración respecto al valor anterior. En el tiempo 4 (T4) a las 18 horas a presentado un valor promedio de $0,65 \pm 0,2551$ mg/L ($p > 0,05$), siendo el valor más alto respecto a todo el experimento; y por último, el tratamiento 5 (T5) a las 24 horas resultó un valor de $0,23 \pm 0,0096$ mg/L ($p > 0,05$), teniendo un descenso en este último tiempo.

Tabla 8

Análisis de variación del fósforo total (promedio \pm desviación estándar)

Tiempo					
	T1	T2	T3	T4	T5
Réplicas					
R1	0,03	0,2	0,48	0,48	0,24
R2	0,04	0,28	0,36	0,44	0,22
R3	0,03	0,25	0,5	1	0,23
R4	0,03	0,26	0,45	0,67	0,24
Promedio	0,03	0,25	0,45	0,65	0,23
Varianza	$0,03 \pm 0,005$	$0,25 \pm 0,033$	$0,45 \pm 0,0618$	$0,65 \pm 0,2551$	$0,23 \pm 0,0096$
Control	$0,00 \pm 0$	$0,08 \pm 0,0187$	$0,13 \pm 0,0369$	$0,20 \pm 0,0532$	$0,06 \pm 0,0386$

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 8, se observa la variación del control de fósforo total con las perlas de alginato de calcio con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas y sometidas a distintos tiempos, obteniendo como resultado valor promedio inicial de $0,00 \pm 0$ mg/L de fósforo total, y un valor promedio final de $0,06 \pm 0,0386$ mg/L de fósforo total.

La evaluación de fósforo total del control en el tiempo 1 (T1) obtuvo un resultado de $0,00 \pm 0$ mg/L de fósforo total, siendo el valor más bajo en las unidades de control. El tiempo 2 (T2) a las 6 horas mostró un valor promedio de $0,08 \pm 0,0187$ mg/L, el cual refleja un aumento respecto al valor inicial. El tiempo 3 (T3) a las 12 horas mostró un incremento en la concentración respecto al valor anterior, obteniendo un valor promedio de $0,13 \pm 0,0369$ mg/L. El tiempo 4 (T4) a las 18 horas a presentado un valor promedio de $0,20 \pm 0,0532$ mg/L, siendo el valor más alto en las unidades de control; y por último el tiempo 5 (T5) a las 24 horas a presentado un valor promedio de $0,06 \pm 0,0386$ mg/L teniendo un declive en el valor.

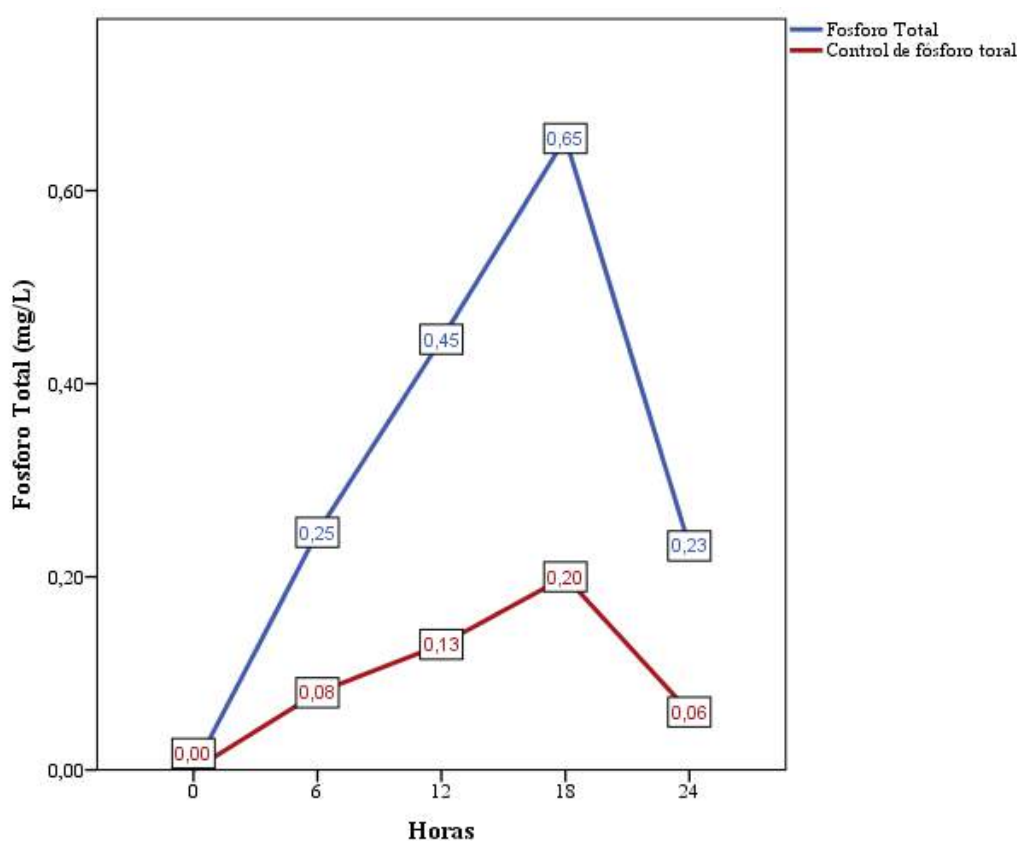


Figura 17. Variación de fósforo total y el control.

En la Figura 17, muestra que las concentraciones del fósforo total del agua del río fueron mayores que el control. Ambos presentan un incremento hasta un valor promedio de $0,62$ mg/L de fósforo total en la experimentación con agua de río Pativilca y $0,20$ mg/L de fósforo total en el control, pero a partir de T4 la

concentración tiene un descenso hasta de 0,23 mg/L de fósforo total en la experimentación con agua de río Pativilca y 0,06 mg/L de fósforo total en el control.

3.1.7. Variación de pH en las Muestras de Agua Extraídas del Afluente del Río Pativilca

En la Tabla 9, se observa la variación del pH presente en las muestras de agua extraída del río Pativilca con las perlas de alginato de calcio con células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas y sometidas a distintos tiempos, obteniendo como resultado un valor promedio inicial de $7,51\pm 0,082$ pH y un valor promedio final de $7,42\pm 0,0618$ pH. Encontrándose diferencia significativa ($p < 0,05$).

La evaluación del pH en el tiempo 1 obtuvo como resultado un valor de $7,51\pm 0,082$ no presentando diferencia significativa ($p > 0,05$). La evaluación en el tiempo 2 (T2) a las 6 horas a presentado a un valor promedio pH de $7,42\pm 0,0618$, siendo el valor más bajo, mostrando una diferencia significativa ($p < 0,05$). En el tiempo 3 (T3) a las 12 horas se obtuvo un valor promedio pH de $7,58\pm 0,0179$ ($p > 0,05$), siendo el más alto, no mostrando diferencia significativa ($p > 0,05$). En el tiempo 4 (T4) a las 18 horas a presentado un valor promedio pH de $7,54\pm 0,0270$ ($p > 0,05$), el cual reflejó un decrecimiento respecto al valor anterior, no mostrando diferencia significativa ($p > 0,05$); y por último en el tiempo 5 (T5) a las 24 horas a presentado el valor promedio pH de $7,53\pm 0,0321$ ($p > 0,05$), teniendo un ligero declive en el valor anterior, no mostrando diferencia significativa ($p > 0,05$).

Tabla 9

Análisis de la variación del parámetro de pH (promedio \pm desviación estándar)

Réplicas	Tiempo				
	T1 (0 horas)	T2 (6 horas)	T3 (12 horas)	T4 (18 horas)	T5 (24 horas)
R1	7,51	7,4	7,55	7,5	7,49
R2	7,51	7,42	7,58	7,54	7,53
R3	7,52	7,45	7,58	7,56	7,51
R4	7,5	7,42	7,6	7,57	7,57
Promedio	7,51	7,42	7,58	7,54	7,53
Varianza	7,51 \pm 0,0082	7,42 \pm 0,0206	7,58 \pm 0,0206	7,54 \pm 0,031	7,53 \pm 0,0342
Control	7,50 \pm 0,005	7,19 \pm 0,0386	6,80 \pm 0,2125	6,80 \pm 0,2265	5,00 \pm 0,1797

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 9, se observa el control de la variación de pH del agua desionizada con las perlas de alginato de calcio con células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas y sometidas a distintos tiempos, obteniendo como resultado un valor promedio inicial pH de 7,50 \pm 0,005 y un valor promedio final pH de 5,00 \pm 0,1797.

La evaluación del control en el tiempo 1 (T1) se obtuvo un resultado a un valor promedio pH de 7,50 \pm 0,005, siendo el valor más alto en la experimentación. En el tiempo 2 (T2) a las 6 horas a presentado el valor promedio pH de 7,19 \pm 0,0620, el cual reflejó un declive respecto al valor anterior, mostrando diferencia significativa. En el tiempo 3 (T3) a las 12 horas a presentado un valor promedio pH de 6,80 \pm 0,3554, el cual reflejó un declive al respecto al valor anterior. En el tiempo 4 (T4) a las 18 horas mostró un valor promedio pH de 6,80 \pm 0,4176, manteniendo el valor promedio al respecto al valor anterior; y por último en el tiempo 5 (T5) a las 24 horas a mostrado un valor promedio pH de 5,00 \pm 0,1797, siendo el valor más bajo en la experimentación.

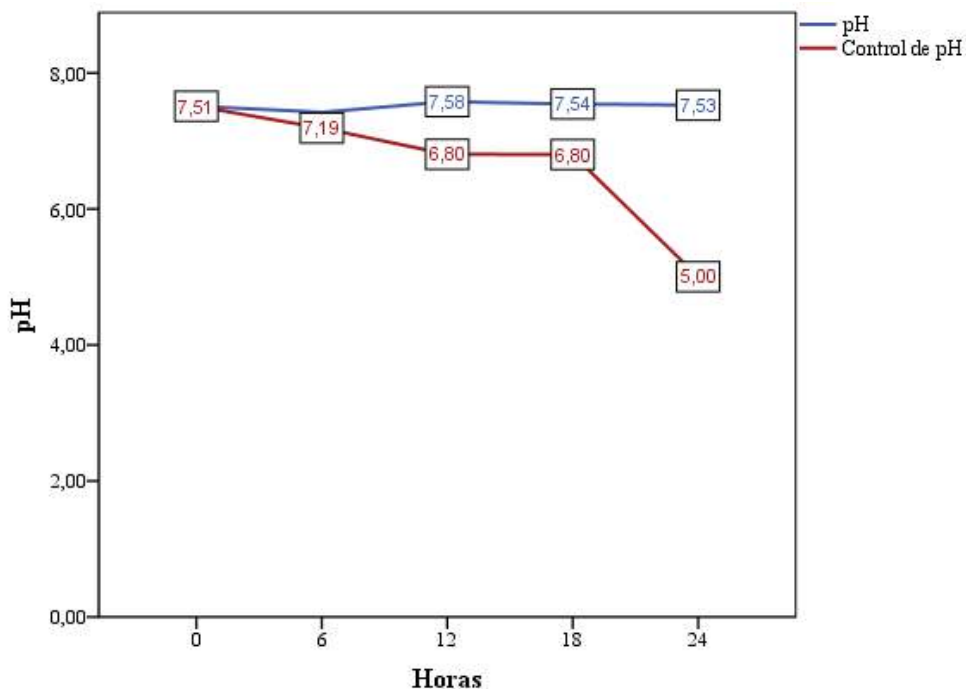


Figura 18. Variación de pH y su control.

En la Figura 18 se aprecia en la gráfica que el pH a lo largo de la experimentación de agua extraída del río Pativilca refleja una leve variación, manteniendo en un rango entre pH de $7,42 \pm 0,0206$ y $7,51 \pm 0,0082$; en cambio el control disminuye el pH a medida que avanza el tiempo, al culminar las 24 horas muestra que descendió hasta un valor promedio pH de $5,00 \pm 0,1797$ de pH volviendo ácido el medio acuoso.

3.1.8. Variación de Conductividad en las Muestras de Agua Extraída del Afluente del Río Pativilca

La conductividad es una propiedad física que permite conocer, durante la experimentación, el aumento o el descenso de otros elementos presentes en el agua. En la Tabla 10, se observa la variación de conductividad presentes en las muestras de agua extraída del afluente del río Pativilca con las perlas de alginato de calcio con células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas y sometidas a distintos tiempos, obteniendo como resultado un valor promedio inicial de 1300 ± 0 $\mu\text{s}/\text{cm}$, y un valor final de $500 \pm 216,0247$ $\mu\text{s}/\text{cm}$.

La evaluación de la conductividad en el tiempo 1 (T1) obtuvo un resultado a un valor de $1300 \pm 0 \mu\text{s/cm}$ ($p < 0,05$). En el tiempo 2 (T2) a las 6 horas a presentado un valor promedio de $2462,60 \pm 125 \mu\text{s/cm}$ ($p < 0,05$), siendo el valor más alto en las unidades del experimento. En el tiempo 3 (T3) a las 12 horas a presentado un valor promedio de $1625,0 \pm 95,7427 \mu\text{s/cm}$ ($p < 0,05$), el cual reflejó un declive respecto al valor anterior. En el tiempo 4 (T4) a las 18 horas a presentado el valor promedio de $1500 \pm 216,0247 \mu\text{s/cm}$ ($p > 0,05$), el cual reflejó un decrecimiento respecto al valor anterior; y por último en el tiempo 5 (T5) a las 24 horas a presentado el valor promedio de $500 \pm 216,0247 \mu\text{s/cm}$ ($p > 0,05$), siendo el valor más bajo de las unidades del experimento.

Tabla 10

Análisis de variación del parámetro de conductividad (promedio \pm desviación estándar)

Tiempo \ Réplicas	Tiempo				
	T1	T2	T3	T4	T5
R1	1300	2600	1500	1500	500
R2	1300	2300	1700	1200	400
R3	1300	2450	1600	1700	800
R4	1300	2500	1700	1600	300
Promedio	1300	2450	1625	1500	500
Varianza	1300 ± 0	$2450,0 \pm 125$	$1625,0 \pm 95,7427$	$1500 \pm 216,0247$	$500 \pm 216,0247$
Control	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$

Fuente: Elaboración propia.

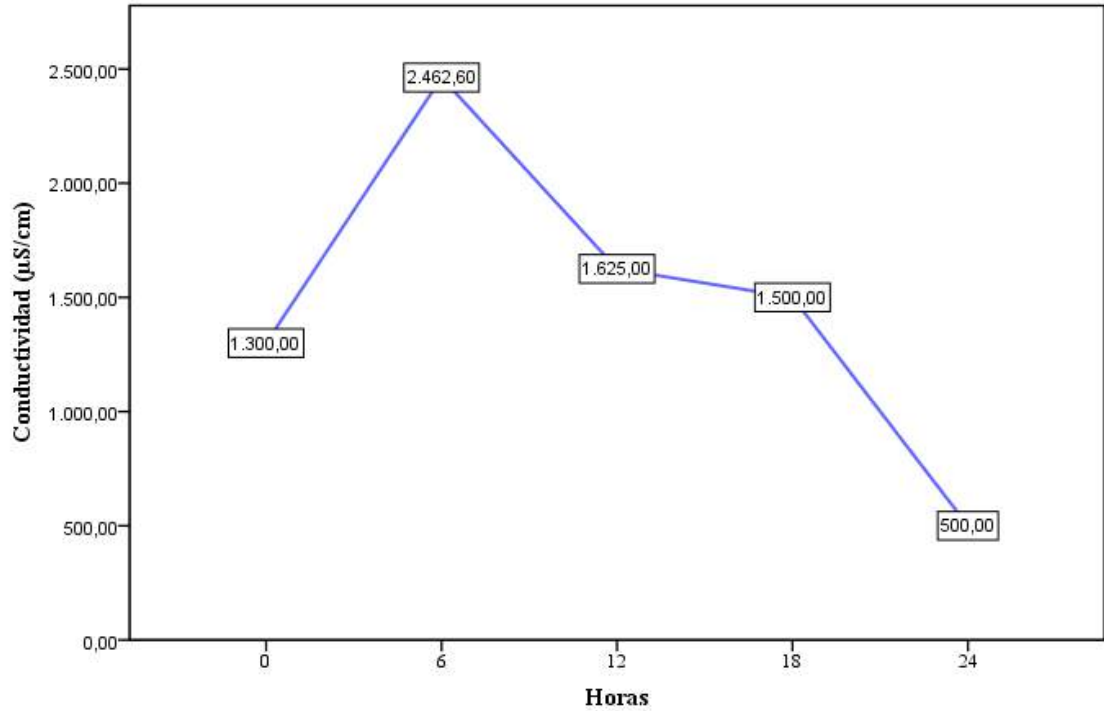


Figura 19. Variación de conductividad.

En la Figura 19, se observa que la variación de la conductividad muestra un ascenso del valor entre los tiempos de T1 a T2, luego a después de las 6 horas de T2 el valor comienza a disminuir hasta las 24 horas.

3.1.9. Variación de la Concentración de Cadmio en las Muestras Extraídas del Afluente del Río Pativilca

En la Tabla 11, se observó la variación de cadmio presentes en las muestras de agua extraída del afluente del río Pativilca con las perlas de alginato de calcio con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas y sometidas a distintos tiempos, obteniendo como resultado un valor promedio inicial de $1,60 \pm 0$ mg/L de cadmio y un valor promedio final de $0,05 \pm 0,0082$ mg/L de cadmio.

El tiempo 1 (T1) se obtuvo un resultado de un valor promedio de $1,60 \pm 0$ mg/L de cadmio ($p > 0,05$), siendo el valor más alto de las unidades experimentales; a partir de las siguientes horas la concentración comenzó a descender. En el tiempo 2 (T2) a las 6 horas presentó un valor promedio de $0,12 \pm 0,0189$ mg/L ($p > 0,05$), el cual

refleja un decrecimiento respecto al valor anterior. En el tiempo 3 (T3) a las 12 horas mostró un valor promedio de $0,09 \pm 0,0042$ mg/L ($p > 0,05$), el cual refleja un decrecimiento respecto al valor anterior. En el tiempo 4 (T4) a las 18 horas presentó un valor promedio de $0,06 \pm 0,015$ mg/L ($p < 0,05$), que muestra un continuo descenso respecto a los valores anteriores; y por último en el tiempo 5 (T5) a las 24 horas presentó un valor promedio de $0,05 \pm 0,0082$ mg/L ($p < 0,05$), siendo en valor más bajo de las unidades de experimentación.

Se observa en la Tabla 11 y Figura 20, en el control de la variación de cadmio del agua desionizada con las perlas de alginato con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 sometidas a distintos tiempos, se mantuvo la concentración en todos los tiempos a un valor de $0,00 \pm 0$ mg/L.

Tabla 11

Análisis de variación en el parámetro del cadmio (promedio \pm desviación estándar)

Tiempo Réplicas	Tiempo				
	T1	T2	T3	T4	T5
R1	1,6	0,11	0,1	0,08	0,05
R2	1,6	0,11	0,09	0,05	0,05
R3	1,6	0,15	0,09	0,05	0,04
R4	1,6	0,12	0,08	0,07	0,06
Promedio	1,6	0,12	0,09	0,06	0,05
Varianza	$1,60 \pm 0$	$0,12 \pm 0,0189$	$0,09 \pm 0,0042$	$0,06 \pm 0,015$	$0,05 \pm 0,0082$
Control	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$

Fuente: Elaboración propia.

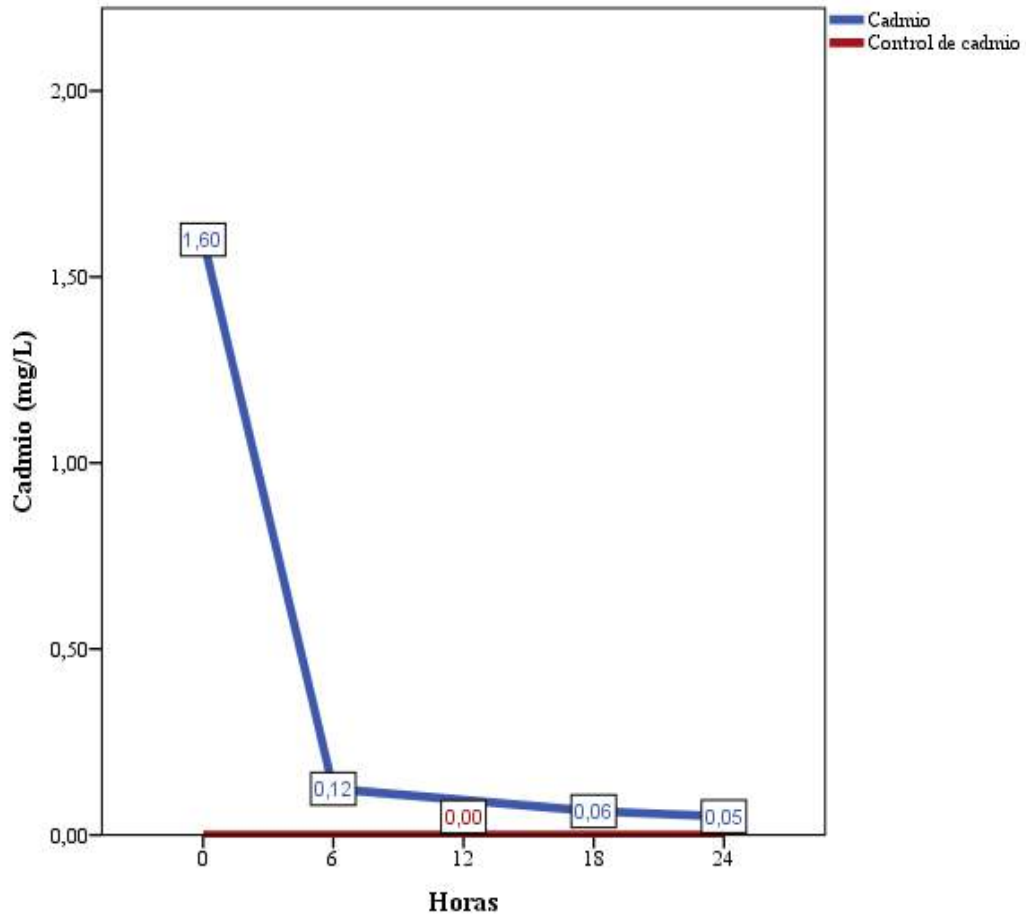


Figura 20. Variación de cadmio y su control.

En la Figura 20, presenta un continuo declive de la concentración de cadmio hasta las 24 horas, siendo que el tiempo 1 hasta el tiempo 2 refleja un mayor decrecimiento de la concentración.

3.1.10. Evaluación de Remoción del Cadmio

La remoción de cadmio en las muestras de agua extraídas del afluente del río Pativilca por la aplicación de perlas de alginato de calcio con células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas, se observa en la Tabla 12, el tiempo 1 (T1) es $0,00 \pm 0$ % debido que es el comienzo del experimento. En el tiempo 2 (T2) a las 6 horas a presentado un valor promedio de $92,34 \pm 1,1831$ %. En el tiempo 3 (T3) a las 12 horas a presentado un valor promedio de $94,38 \pm 0,5103$ %, el cual refleja un aumento de remoción respecto al valor anterior. En el tiempo 4 (T4) a las 18 horas a presentado un valor promedio de $96,09 \pm 0,9375$ %, el cual refleja una

continua remoción respecto al valor anterior; y por último en el tiempo 5 (T5) a las 24 horas a presentado un valor promedio de $96,88 \pm 0,5103$ %, siendo el valor más alto en la remoción de cadmio

Tabla 12

Remoción en porcentaje de cadmio (promedio \pm desviación estándar)

Tiempo \ Réplicas	Tiempo				
	T1	T2	T3	T4	T5
R1	0	93,13	93,75	95,00	96,88
R2	0	93,13	94,38	96,88	96,88
R3	0	90,63	94,38	96,88	97,50
R4	0	92,50	95,00	95,63	96,25
Promedio	0	92,34	94,38	96,09	96,88
Varianza	0,00 \pm 0	92,34 \pm 1,1831	94,38 \pm 0,5103	96,09 \pm 0,9375	96,88 \pm 0,5103

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 21 se observa, la *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptada obtuvo una mayor remoción de cadmio en las primeras 6 horas con un 92,34 % del T1 a T2; a partir de T2 hasta T5 la remoción fue reduciéndose.

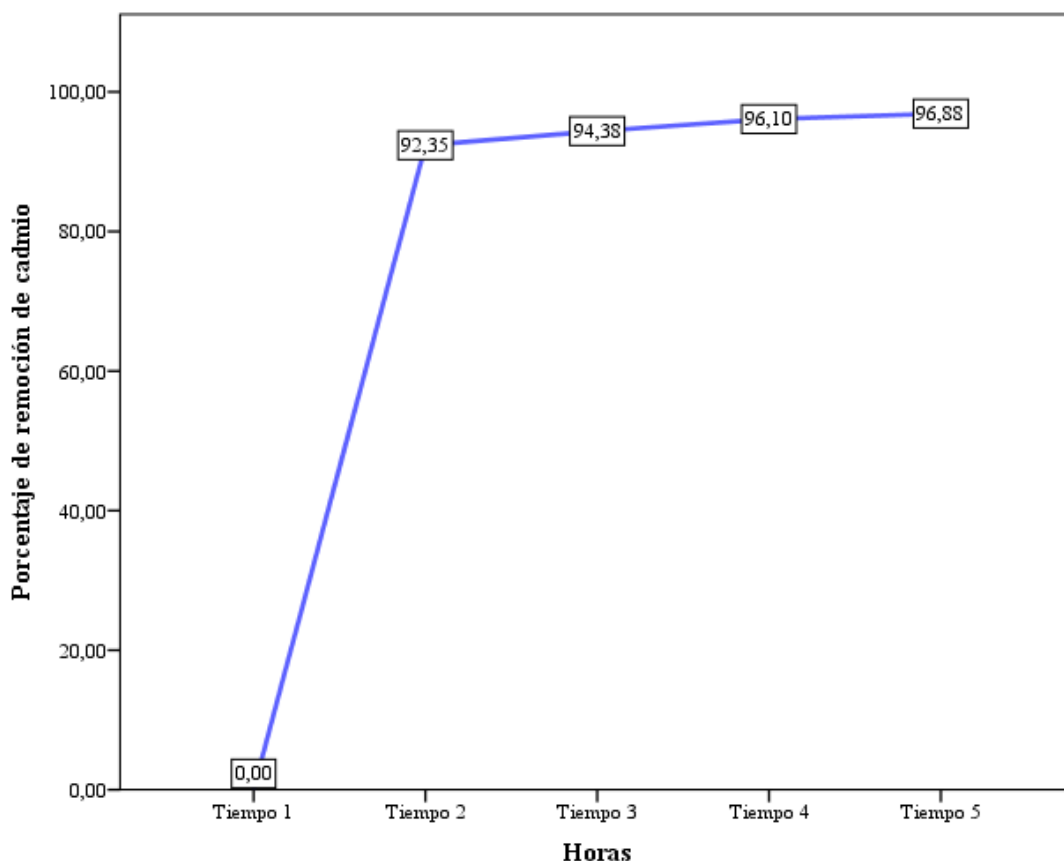


Figura 21. Remoción de cadmio.

3.1.11. Variación de la Concentración de Plomo en las Muestras de Agua Extraída del Afluyente del Río Pativilca

En la Tabla 13, se observa la variación de plomo presentes en las muestras de agua extraída del afluyente del río Pativilca con las perlas de alginato de calcio con células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas y sometidas, obteniendo como resultado un valor promedio inicial de $2,77 \pm 0$ mg/L y un valor promedio final de $0,8 \pm 0,0287$ mg/L.

La evaluación de la variación de la concentración de plomo en el tiempo 1 (T1) obtuvo un resultado de un valor promedio de $2,77 \pm 0$ mg/L de plomo ($p < 0,05$), siendo el valor más alto en el experimento. En el tiempo 2 (T2) a las 6 horas a presentado un valor promedio de $0,51 \pm 0,1895$ mg/L ($p > 0,05$), siendo el valor más bajo. En el tiempo 3 (T3) a las 12 horas mostró un valor promedio de $0,83 \pm 0,1139$

mg/L ($p>0,05$), el cual refleja un incremento respecto al valor anterior. En el tiempo 4 (T4) a las 18 horas a presentado un valor promedio de $1,1\pm 0,3386$ mg/L ($p>0,05$), el cual reflejó un continuo incremento respecto al valor anterior; y por último en el tiempo 5 (T5) a las 24 horas mostró un valor promedio de $0,8\pm 0,0287$ mg/L ($p>0,05$), teniendo un decrecimiento en el valor.

Tabla 13

Análisis de la variación en el parámetro de plomo (promedio \pm desviación estándar)

Tiempo \ Réplicas	Tiempo				
	T1	T2	T3	T4	T5
R1	2,77	0,24	0,8	1,6	0,8
R2	2,77	0,69	0,73	1,03	0,83
R3	2,77	0,55	0,78	0,91	0,76
R4	2,77	0,54	0,99	0,87	0,8
Promedio	2,77	0,51	0,83	1,1	0,798
Varianza	$2,77\pm 0$	$0,51\pm 0,1895$	$0,83\pm 0,1139$	$1,1\pm 0,3386$	$0,8\pm 0,0287$
Control	$0,00\pm 0$	$0,00\pm 0$	$0,00\pm 0$	$0,00\pm 0$	$0,00\pm 0$

Fuente: Elaboración propia.

Se observa en la Tabla 13 y Figura 22, en el control de la variación de plomo del agua desionizada con las perlas de alginato de calcio con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 sometidas a distintos tiempos, se mantuvo la concentración en todos los tiempos a un valor de $0,00\pm 0$ mg/L.

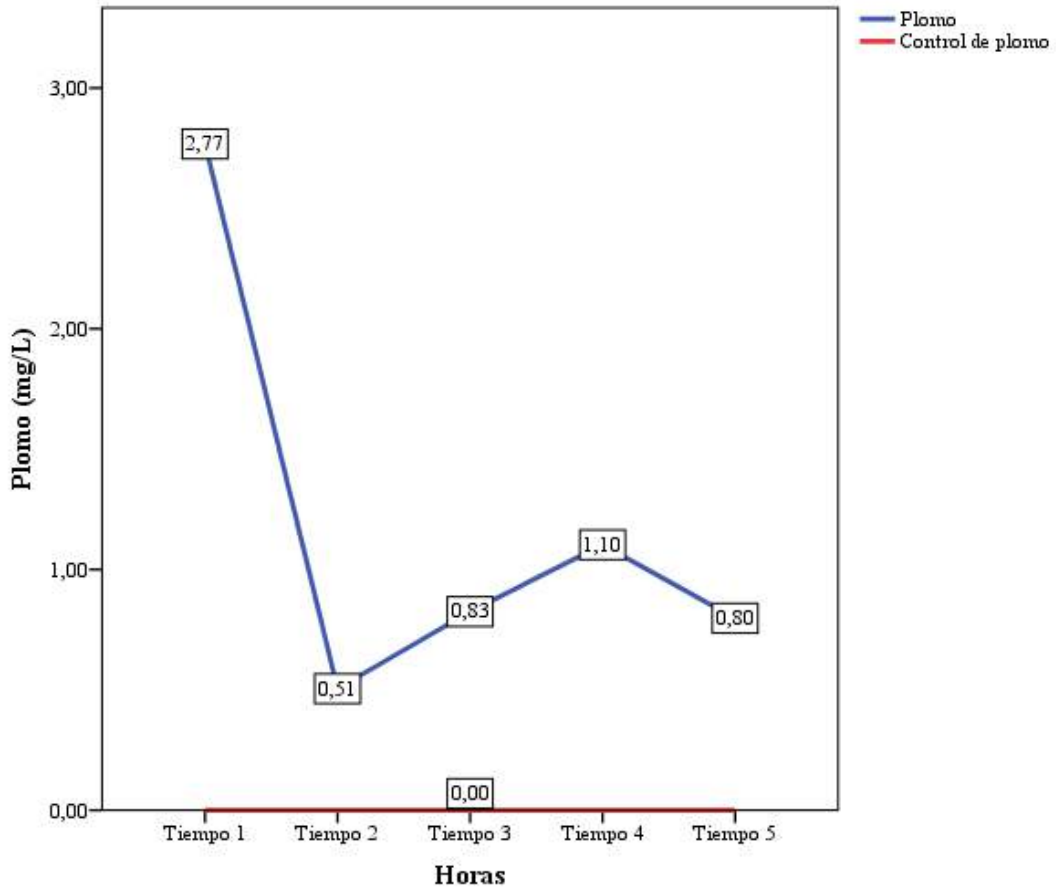


Figura 22. Variación de plomo y su control.

3.1.12. Evaluación de Remoción en Plomo

La remoción de plomo en las muestras de agua extraídas del afluente del río Pativilca por la aplicación de perlas de alginato de calcio con células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas, se observa en la Tabla 14, el tiempo 1 (T1) es $0,00 \pm 0$ % debido que es el comienzo del experimento. En el tiempo (T2) a las horas a presentado remoción a un valor promedio de $81,77 \pm 6,8402$ %, siendo el valor promedio de mayor remoción. El en Tiempo (T3) a las 12 horas presentó un valor promedio de $70,22 \pm 4,1109$ % de remoción, el cual refleja un decrecimiento respecto al valor anterior. En el tiempo (T4) a las 18 horas mostró un valor promedio de $60,2 \pm 12,2224$ %, el cual refleja un declive respecto al valor anterior; por último en el tiempo (T5) a las 24 horas mostró un valor promedio de $71,21 \pm 1,0369$ % de remoción.

Tabla 14

Remoción en porcentaje de plomo (promedio \pm desviación estándar)

Replicas	Tiempo				
	T1	T2	T3	T4	T5
R1	0	91,34	71,12	42,24	71,12
R2	0	75,09	73,65	62,82	70,04
R3	0	80,14	71,84	67,15	72,56
R4	0	80,51	64,26	68,59	71,12
Promedio	0	81,77	70,22	60,20	71,21
Varianza	0,00 \pm 0	81,77 \pm 6,8402	70,22 \pm 4,1109	60,2 \pm 12,2224	71,21 \pm 1,0369

Fuente: Elaboración propia.

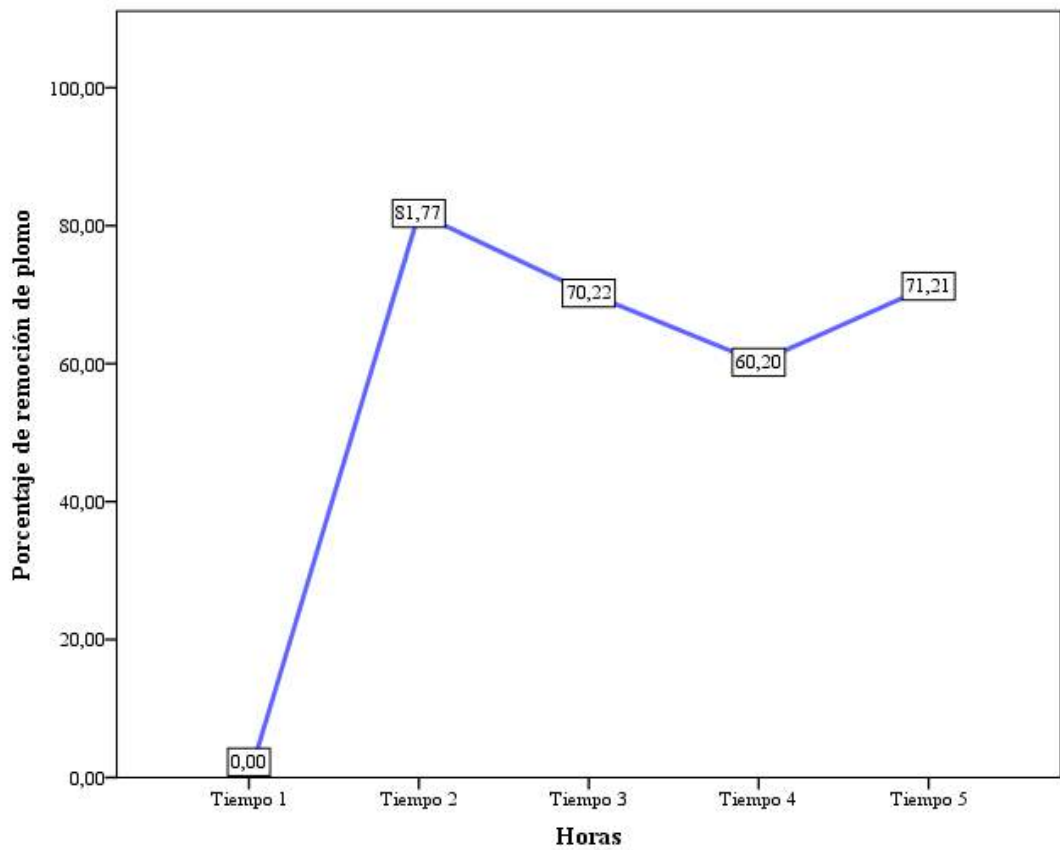


Figura 23. Remoción de plomo.

En la Figura 23, se observa liberación de plomo al agua por las perlas de alginato de calcio con células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128, en los valores promedios de los tiempos 3 y 4, aunque después vuelve a remover el metal.

3.1.13. Características Físico-químicos Finales de las Muestras de Agua Extraída del Afluente Después del Tratamiento

La Tabla 15, se observa los resultados finales de los parámetros físico-químicos de la muestra extraída del afluente del río Pativilca luego del tratamiento con perlas de alginato de calcio con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 al culminar con las 24 horas.

Comparando con los Estándares de Calidad de Agua (ECA) de la categoría 3, los parámetros de conductividad y pH se encuentran por debajo exigido por la norma. En cadmio, solo cumple para bebidas de animales (Apéndice 33); en cambio el plomo no alcanza a estar por debajo de lo estipulado en la norma. Mientras que los parámetros de nitrógeno total y fosforo total no encuentran dentro de la norma ECA.

Tabla 15

Resultados finales de los análisis físico-químico de la muestra del afluente del río Pativilca luego del tratamiento con perlas de alginato de calcio con Pseudomonas putida ATCC 49128 a las 24 horas (promedio \pm desviación estándar)

Parámetros	Unidades	Resultado
Nitrógeno total	mg/L	0,42 \pm 0,0650
Fósforo	mg/L	0,23 \pm 0,0096
Plomo	mg/L	0,8 \pm 0,0287
Cadmio	mg/L	0,05 \pm 0,0082
Conductividad	μ s/cm	500 \pm 216,0247
pH	Unidad de pH	7,53 \pm 0,0342

Fuente: Elaboración propia.

3.2. DISCUSIÓN

Las bacterias del género *Pseudomonas* han mostrado ser tolerantes a los metales pesados en concentraciones elevadas, así como otros compuestos xenobiótico (Rodríguez et al., 2017). La presente investigación mostró que la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128 mantiene un rango de tolerancia al cadmio y plomo, evidenciado su crecimiento poblacional a través de la densidad óptica, observándose que las altas concentraciones de los metales pesados no inhibieron a las poblaciones de *Pseudomonas*. Esta tolerancia a los metales pesados se puede deber a que las bacterias tienen la propiedad de acumular y distribuir los iones metálicos pudiendo ocurrir dichos sucesos a nivel de la membrana celular, espacio periplásmico y en el interior celular, también puede ser captado por polímeros celulares y extracelulares, evitando su interacción con otros nutrientes esenciales (Marrero, Díaz & Coto, 2010). Se observó que el aumento de las concentraciones de los metales de cadmio y plomo produjo un descenso en la densidad poblacional de *P. putida* de $374,33 \pm 3,05$ UNT hasta $192,33 \pm 1,52$ UNT en plomo; en cadmio de $736,67 \pm 4,93$ UNT hasta $206,33 \pm 2,08$ UNT. Estudios de Hu & Zhao (2007), sobre la *Pseudomonas putida* aisladas del suelo con presencia de cadmio, reportaron que la máxima concentración de tolerancia fue de 7,3 mM y 7,2 mM para los metales cadmio y plomo respectivamente, sin inhibición completa de crecimiento bacteriano. Un estudio similar reportado por Azoddein et al. (2015), que empleaban mercurio y la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en caldo nutritivo añadido a una muestra de agua residuales de una planta industrial petrolera (presencia de mercurio con la concentración de 22 ppb), se observó que la densidad poblacional celular resultó ser de 2150 UNT, siendo mayor al crecimiento celular de la bacteria en caldo nutritivo y la bacteria en la muestra de agua residual con 395 UNT y 213 UNT respectivamente; por otro lado, Chen et al. (2006), hace referencia que la tolerancia de la bacterias por metales pesados se puede obtener diferentes resultados, por la diversidad de medios de cultivos y condiciones de incubación.

El río Pativilca se encuentra considerado dentro de la categoría 03 de ríos por las normas legales del Perú (según la Resolución Jefatural N° 202-2010 por la Autoridad Nacional del Agua), y es monitoreada por la Autoridad Nacional del Agua (ANA). Según la ANA

(2014), señala que en el monitoreo realizado en el río Pativilca, se encontró que los metales cadmio y plomo sobrepasan los límites de los estándares de calidad de agua en categoría 03 (por el decreto supremo 002-2008 Ministerio del Ambiente), con un valor de 0,0051 mg/L en cadmio y 0,0559 mg/L en plomo. En la presente investigación el análisis de los parámetros del agua extraída del río Pativilca mostró una alta concentración con un valor de $2,77 \pm 0$ mg/L en plomo y $1,66 \pm 0$ mg/L en cadmio, superando los estándares de calidad de agua que actualmente se encuentran en la legislación peruana (Decreto Supremo 004-2017 Ministerio del Ambiente); en el que se establece como máximo valor 0,01 mg/L de cadmio en agua de riego para vegetales y 0,05 mg/L en agua para bebida de animales; mientras que el máximo valor de plomo es de 0,05 mg/L para los dos tipos de actividades.

La variación de nitrógeno total y fósforo total en la presente investigación muestran un incremento hasta las 18 horas de exposición; para posteriormente exhibir una fuerte caída ($p < 0,05$) hacia las 24 horas. Existen resultados similares a esta investigación como los reportados por Susithra, Banu, Lucky & Dawood (2009), obtuvieron un resultado inicial del efluente con valores de 61 ± 10 mg/L de nitrógeno total y 9.2 ± 2.7 mg/L de fósforo total; el cual, evidenciaron que durante los primeros 10 primeros días de experimentación, la bacteria *Pseudomonas putida*, mostró una disminución de los valores hasta de 46.5 ± 8.7 mg/L de nitrógeno total y 7.1 ± 1.8 mg/L de fósforo total en los efluentes. En otro estudio, se muestra que la *Pseudomonas putida* no solo presenta remoción en medio acuoso, sino también en suelos contaminados, tal es el caso en la investigación llevada a cabo por Martínez & Rodríguez (2013) donde se observó que la *Pseudomonas putida* redujo el fósforo hasta un 76 % en 10 días, mientras que el nitrógeno se redujo a un 34 % en el segundo día. En un estudio realizado por Sunar, Emparan, Gani & Leman (2016), acerca de la reducción por contaminación con biodiesel en el suelo, en la que se empleó a la bacteria *Pseudomonas putida* para dicho fin, se analizó la variación de los valores del fósforo y nitrógeno total, que resultó en una reducción de la concentración en un 77% y 82 % respectivamente, en un tiempo de 24 días. Por lo explicado anteriormente, el aumento del fósforo total en las muestras de agua puede ser debido al proceso de solubilidad de fosfatos, ya que, Según Corrales, Arévalo y Moreno (2014), las bacterias del género *Pseudomonas* poseen la capacidad

de solubilizar fosfatos, el cual generan ácidos orgánicos, que tiene como funcionalidad de intervenir en la detoxificación por metales. Además, este género bacteriano produce enzimas fosfatasa a consecuencia de una baja presencia de fósforo en el medio, este proceso es un mecanismo bioquímico de supervivencia. La bacteria por medio de este proceso metabólico efectúa la solubilización del fósforo realizando la hidrólisis de enlaces éster del fosfato orgánico, originando la disponibilidad de fosfato inorgánico soluble. Las bacterias del género *Pseudomonas* en circunstancia de altas concentraciones de fósforo tiene la capacidad de reducir dicho elemento, por lo que Según Knobelsdorf (2005), se debe a que este género puede acumular fósforo y almacenarlo en forma de gránulos de polifosfatos bajo condiciones aerobias tal como ha sido realizado en la presente investigación.

El aumento de los valores del nitrógeno total puede ser debido a que el género *Pseudomonas* pertenece a un grupo de bacterias con la capacidad de fijar de nitrógeno por medio de un complejo enzimático denominado nitrogenasa, de esta manera captura el nitrógeno atmosférico y lo transforma a amoníaco. El género de *Pseudomonas* es considerado como un grupo de bacterias desnitrificadoras que reduce los diferentes compuestos nitrogenados hasta ser convertidos en nitrógeno gaseoso, en condiciones anaerobias o baja tensión de oxígeno (Madigan et al., 2009).

En la presente investigación el pH se mostró constante en el tratamiento con valores promedio mínimo de $7,42 \pm 0,0206$ y un máximo de $7,58 \pm 0,0206$ ($p > 0,05$); sin embargo, el control presentó un decrecimiento ($p < 0,05$) desde el inicio del experimento $7,50 \pm 0,005$ hasta su culminación con un valor promedio de $5,00 \pm 0,1797$. La investigación de Shirdam, Khanafari y Tabatabaee (2006), señala que el pH óptimo para la remoción de plomo por *Pseudomonas putida* es de 6,0 - 6,5. Por otro lado, Pardo et al. (2003), manifiestan que el parámetro pH influye en los procesos de sorción de las bacterias, esto se evidencia en bacterias de la especie *Pseudomonas putida* sometidas en diferentes valores de pH, siendo el pH óptimo de 6,0 para una acumulación máxima de 8mg/g de cadmio, corroborado por la ecuación de Langmuir. En cambio, en ensayos de remoción de plomo, se presentó un pH 6,5 que resultó ser óptimo para la remoción y

una acumulación máxima de 56,2 mg/g de plomo. Los autores sugieren que la remoción de los metales puede deberse a la atracción iónica de estos con la biomasa de *Pseudomonas putida*, además explican que los valores bajos de pH ayudan a incrementar la carga aniónica de la superficie de la membrana celular inactiva, generando una reducción en la atracción entre los iones metálicos. Cuando se incrementa el pH la carga negativa mejora el proceso de la retención de la superficie, hasta llegar al valor de pH 7; el incremento por encima de este valor genera la competencia de sitios activos con los complejos hidroxilados de metal, causando disminución en la retención de estos. En la presente investigación, el control presentó valores bajos de pH, relacionados con el aumento de los valores del fósforo total, ya que la *Pseudomonas* tiene la capacidad de efectuar el proceso de la solubilidad del fosfato, dejándolo disponible en el medio acuoso; sin embargo, dicho proceso genera ácidos orgánicos que provocan como consecuencia que el agua alcance niveles de pH ácidos (Corrales et al., 2014). La acidez del agua, también puede estar relacionado con el incremento de los valores de nitrógeno total, debido que la *Pseudomonas* es considerada como una bacteria nitrificante, cuyo proceso consta de la transformación del nitrógeno gaseoso a nitrógeno amoniacal; ya que se produce un aumento de los protones de hidrógeno (H^+) (Claros, 2012).

En la presente investigación se observa el aumento de los valores de la conductividad ($p < 0,05$) hasta las 6 horas del inicio de la experimentación, esto debido que el agua pudo contener algún elemento traza como el calcio que influyó directamente con los resultados de conductividad; posteriormente, se observó un decrecimiento del valor en la conductividad, y puede estar relacionado con algún elemento(s) que este interactuando con la bacteria con el propósito de retener los metales, como lo reporta Higham, Sadler & Scawen (1985), quienes en un estudio con *Pseudomonas putida*, mostraron una reducción de la concentración del Ca^{2+} (calcio) en el medio acuoso, lo que explica que la batería retenía el cadmio y no lo liberaba. En otro estudio Leive (1974) citado por Higham, Sadler & Scawen (1986, p. 1481), postula que las células estabilizan la membrana externa y establece la principal barrera de permeabilidad, mediante puentes iónicos formados por los cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}) entre los grupos de fosfatos de LPS. El Ca^{2+} puede ser reemplazado por la competitividad de los

iones que habitualmente funcionan como puentes catiónicos, que puede alterar el empaquetamiento de los lípidos existentes en la membrana por la presencia del Cd^{2+} .

Estudios señalan que las bacterias del género *Pseudomonas* poseen capacidad de reducir concentraciones de cadmio del medio que los rodea, este es el caso para las especies: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Pseudomonas putida* que remueven hasta 50-66 %, 66 %, 90 %, 90 % respectivamente (Bayona et al., 2009, Shirdam et al., 2006). Investigaciones realizadas a la especie *Pseudomonas mendocina* en la que se empleó 2 g/L de biomasa libre en relación biomasa-metal, bajo los siguientes parámetros de experimentación: pH de 6,0; agitación a una velocidad de 100 rpm y una temperatura de 28 °C, mostró que es capaz de acumular hasta un valor promedio de $41,7 \pm 2,32$ mg/g de cadmio, con la concentración inicial de 1,5 mM/L (Carballo et al., 2017). La presente investigación muestra que la biomasa de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizada en perlas de alginato de calcio logra una remoción de cadmio del 92,34 % en las 6 primeras horas de estar en contacto con muestras de agua del río Pativilca y una remoción final de 96,88 % al culminar las 24 horas de experimentación. Similar resultado de remoción fueron reportados por Andreoni, Colombo, Colombo, Vecchio & Finoli (2003), donde la bacteria *Pseudomonas putida* removió el 95,4 % de cadmio un medio acuoso a un pH de 7. Por otro lado, Pabst, Dimkpa, Anderson & Mclean (2010), mencionan que la *Pseudomonas putida* sometida a concentraciones de 10 mg/L de cadmio en un medio de cultivo, no afecta en la capacidad de crecimiento de la biomasa bacteriana. Además, mencionan que la célula se asoció al 90 % del cadmio inicial, principalmente a nivel de la superficie de la célula, mientras que la concentración máxima en el citoplasma fue menor de 1 mmol/kg de cadmio. La interacción entre el cadmio y las células de la *Pseudomonas putida* también lo reportan en la investigación realizada por Ueshima, Ginn, Haack, Szymanowski & Fein (2008), en el que, mediante el empleo de microscopía electrónica de fluorescencia, muestra la unión del cadmio en las paredes de la célula bacteriana, sin embargo, cabe resaltar la interacción entre el metal y las células con EPS (sustancias poliméricas extracelulares) muestra que puede unir concentraciones significativas de cadmio. De la misma manera, se reportó en el estudio llevado a cabo por Pabst et al. (2010), en el que el cadmio se adhiere a la superficie de las células de

las *Pseudomonas putida*, y que la presencia del metal en células vivas puede inducir a la producción de mayor cantidad de EPS para protegerse.

Diferentes investigadores coinciden al mencionar que otras especies del género *Pseudomonas* tienen la capacidad de remover o disminuir la concentración del plomo del medio que las rodea, así es el caso para las especies: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans* y *Pseudomonas fluorescens*, que logran alcanzar una remoción de 97,4 %, 55 % y 68,18 % respectivamente (Singh & Gadi, 2012; Tur et al., 2013; Bayona et al., 2009). La presente investigación muestra que la remoción de plomo por bacterias de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en perlas de alginato de calcio obteniendo un valor promedio de remoción del $81,77 \pm 6,8402$ % en las 6 primeras horas y un valor promedio de remoción final de 71,21 % al culminar las 24 horas. Además, en la presente investigación se ha evidenciado la remoción de plomo, como también la liberación del metal, que pudo deberse a la presencia o ausencia de otros elementos químicos en el agua, como lo reportado por Higham et al. (1985), quienes añadieron 0,6 % tolueno en el agua experimental, lo que provocó la liberación del 88 % de cadmio (Cd^+) acumulado en la *Pseudomonas putida*. Todos estos mecanismos evidencian que la *Pseudomonas putida* tiene la capacidad de interacción entre los iones de plomo con los grupos fosfato y lipopolisacáridos (LPS) presentes en la membrana externa, como también podría tener interacción con otros de metales pesados y elementos como el germanio (Klapcinska, 1994; Klapcinska & Chmielowski, 1986).

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

1. Las bacterias de la cepa de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizadas en la matriz polimérica de alginato de calcio, mostraron una alta capacidad de remoción de plomo y cadmio presentes en el agua extraída del afluente del río Pativilca con un valor promedio de $71,21 \pm 1,0369$ % y $96,88 \pm 0,5103$ % respectivamente.
2. Las bacterias de la cepa de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 lograron tolerar la exposición a los metales de cadmio y plomo en concentraciones desde 0,01 mg/ml hasta 0,1 mg/ml en el proceso de adaptación, y esto por un mecanismo detoxificador, propio de esta especie. No se observó inhibición en el crecimiento poblacional de la cepa a las concentraciones expuestas en la presente investigación.
3. La morfología de las esferas de alginato de calcio conteniendo células inmovilizadas de la bacteria *Pseudomonas putida* ATCC 49128, permaneció estable en el tiempo, permitiendo que el proceso de remoción de plomo y cadmio sea exitoso en la presente investigación.
4. La conductividad eléctrica, mostró una disminución, similar a la reducción final de iones plomo y cadmio presentes en los resultados. Manteniéndose, por debajo de los valores indicados en los estándares de calidad de agua en categoría 03 de la normativa peruana, en cambio el plomo y el cadmio no lograron alcanzar los valores de la norma.
5. Los resultados de pH obtenidos para el proceso biotecnológico en la remoción fueron en un rango de $7,42 \pm 0,0206$ a $7,58 \pm 0,0206$ de pH, que influyeron directamente en la remoción de plomo y cadmio del río Pativilca.

CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES

1. Evaluar la capacidad de remoción de plomo o cadmio en otras especies de bacterias o asociadas a un consorcio.
2. Evaluar otros tipos de matrices de inmovilización más económicos empleando la *Pseudomonas putida* ATCC 49128.
3. Evaluar la capacidad de la *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en la remoción de otros metales pesados.
4. Evaluar otros parámetros físico-químicos (parámetros de calcio, magnesio, alcalinidad, entre otros) en el proceso de remoción de cadmio y plomo.
5. Realizar mediciones de remoción de metales pesados a diferentes valores de pH.

REFERENCIAS

- Agency For Toxic Substances And Disease Registry. (2012). *Toxicological profile for cadmium*. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services.
- Alanis, E. & Guerrero, I. (2004). *Pseudomonas* en Biotecnología. *Bio Tecnología*. 9(1), 26 – 37.
- Andreoni, V., Colombo, M., Colombo, A., Vecchio, A. & Finoli, C. (2003). Cadmium and zinc removal by growing cells of *Pseudomonas putida* strain B14 isolated from a metal-impacted soil. *Annals of Microbiology*, 53 (2), 135-148.
- Aquiahuatl, M. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio. Microbiología General*. (1 st. Ed). México: Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.
- Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y Establecen Disposiciones Complementarias. Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú, 07 de julio de 2017, pp. 10-19.
- Arevalo, P. J. (2015). *Evaluación del cumplimiento de los objetivos de calidad en el proceso de reglamentación de corrientes priorizadas en la jurisdicción de la corporación autónoma regional de Cundinamarca – CAR*. (Tesis de grado). Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá, Colombia.
- Autoridad Nacional del Agua (2014). *Perú: Informe de calidad de agua del río Pativilca*. Lima: ANA.
- Avendaño, G., López, A. & Palou, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7, 87-96.
- Azoddein, A., Ahmad, M., Yunus, R. & Sulaiman, N. (2016). A bioremediation approach to mercury removal in a shake flask culture using *Pseudomonas putida* (ATCC 49128). *Analytical & Bioanalytical Techniques*. 7(3), 2–6.
- Azoddein, A., Mamat, M. & Athirarh N. (2017). Effect of Temperature on *Pseudomonas Putida* to Remove Mercury. *Symposium on Innovation and Creativity*. 1, 1- 4.
- Azoddein, A., Yunus, R., Sulaiman, N., Bustary, B. & Azli, F. (2015). Mercury removal from petroleum based industries wastewater by *P. putida*. *International journal of scientific & technology research*. 4, 32-39.
- Azoddein, A., Yunus, M., Sulaiman, N., Bustary, A & Sabar, K. (2015). Mercury removal using *Pseudomonas putida* (ATTC49128): effect of acclimatization time, speed and temperature of incubator shaker. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 9(2), 204-209.
- Azpiroz, I., Xavier, F., Damasceno, A., Diaz, E., Lauronce, V., Mendiola, I. & Urrizalqui, I. (2007). *Glosario INDICANG*. España: INDICANG.

- Azcona, M., Ramírez, R. & Vicente, G. (2015). Efectos tóxicos del plomo. *Revista de Especialidades Médico Quirúrgicas*. 20, 72-77. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2015/rmq1511.pdf>
- Bautista, D. A. (2008). *Bioadsorción de metales pesados mediante el uso de biomasa bacteriana aislada de jales mineros*. (Tesis de maestría). Instituto Tecnológico y de Estudios Superior de Monterrey, Monterrey, México.
- Bayona, B., Sánchez, S., Cisneros, E., Escobedo, J., Moorillón, M., Muñoz, R., García B. & Enríquez G. (2009). Tratamiento biológico del agua residual procedente de una industria papelera mediante la utilización de una columna empacada. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. 5 (2), 180-185.
- Beltrán, M. & Gómez, A. (2015). Metales pesados (Cd, Cr y Hg): su impacto en el ambiente y posibles estrategias biotecnológicas para su remediación. *Revista I3+*. 2 (2), 82-112. doi.org/10.24267/23462329.113
- Beltrán, M. & Gómez, A. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Facultad de Ciencias Básicas*. 12 (2). Recuperado de <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/viewFile/2027/1835>
- Castañé, M., Topolián, L., Cordero, R. & Salibián, A. (2003). Influencia de la especiación de los metales pesados en el medio acuático como determinante de su toxicidad. *Toxicología*. 20(1), 13-8. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91920103>
- Castillo, P. & Tejero, I. (1999). Consideraciones de diseño para la eliminación biológica de fósforo empleando procesos biopelícula. *Ingeniería del Agua*. 6(1), 69-80. doi.org/10.4995/ia.1999.2779
- Carballo, M., Martínez, A., Salgado, I., Pérez, L., Cruz, M., Liva, M., Alleyne, S., Rodríguez, M. & Garza, Y. (2017). Standardization of variables involved in cadmium and zinc microbial removal from aqueous solutions. *Biotecnología Aplicada*, 34(1), 1221-1225.
- Chen, X., Shim J., Chen, Y., Xu, X., Xu, S. & Wang, Y. (2006). Tolerance and biosorption of copper and zinc by *Pseudomonas putida* CZ1 isolated from metal-polluted soil. *Canadian Journal of Microbiology*. 52(4), 308-316. doi.org/10.1139/w05-157
- Chen, X., Wang, Y., Lin, Q., Shi, J., Wu, W. & Chen, Y. (2005). Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*. 46 (2), 101-107. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.10.003
- 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.

- 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*. (Tesis de doctorado). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Covarrubias, S., García, J. & Peña, J. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria*. 25 (3), 40-45. doi.org/10.15174/au.2015.907
- Corrales, L., Arévalo, Z. & Moreno, V. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. 12 (21). *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 12 (21), 67-79.
- Corro, A. (2015). *Evaluación y simulación de la contaminación por metales pesados en la subcuenca de la Ciénega de Chapala, Michoacán*. (Tesis de grado). Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México.
- Del Águila, R. A. (2010). *Biodesulfuración de fracciones petrolíferas con Pseudomonas putida CECT5279: Optimización del proceso*. (Tesis de doctorado) Universidad de Alcalá, Madrid, España.
- Enríquez, R. F. (2012). *Estudio del estado actual de las fuentes abastecedoras de agua de consumo humano para el Cantón Pindal*. (Tesis de grado). Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Escobar, J. (2002). *La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar*. Chile: CEPAL.
- Fajardo, R., Osuna, J., Velázquez, C., Escalante, P. & Ibarra, V. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(6), 42-56.
- González, M. & Saldarriaga, J. (2008). Remoción biológica de materia orgánica, nitrógeno y fósforo en un sistema tipo anaerobio-anóxico-aerobio. *EIA*, 1 (10), 45-53.
- González, M. O. (2015). Determinación de las principales fuentes de contaminación del río Portoviejo, en el sector entre Andrés de Vera y Picoazá, del cantón Portoviejo. (Tesis de grado). Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.
- Grant, T., Morris, R., Rees, A., Smith, J. & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters*. 32(1), 195-198. [doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7)
- Graza, F. W. (2015). *Determinación de Pb, Cd, As en aguas del río santa en el pasivo minero ambiental de Recuay, Tícapampa; Recuay – Ancash*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

- Herrera, J. P. (2014). Aislamiento de bacterias resistentes al plomo a partir de suelos contaminados con este metal. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, Costa Rica.
- Higham, P., Sadler, J. & Scawen, M. (1985). Cadmium resistance in *Pseudomonas putida*: growth and uptake of cadmium. *Journal of General Microbiology*. 131, 2539- 2544. doi.org/10.1099/00221287-131-10-2539
- Higham, D., Sadler, P. & Scawen, M. (1986). Effect of cadmium on the morphology, membrane integrity and permeability of *Pseudomonas putida*. *Journal of General Microbiology*. 132 (6), 1475-1482. doi.org/10.1099/00221287-132-6-1475
- Hu, N. & Zhao, B. (2007). Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2. *FEMS Microbiology Letters*. 267 (1), 17–22. doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00505.x
- Hussein, H., Farag Ibrahim, S., Kandeel, K. & Moawad, H. (2004). Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas sp.*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7 (1), 38-46.
- Hynek, D., Prasek, J., Pikula, J., Vojtech, A., Hajkova, P., Ludmila, K., Trnkova, L., Sochor, J., Pohanka, M., Hubalek, J., Beklova, M., Vrba, R. & Kizek, R. (2011). Electrochemical analysis of lead toxicosis in vultures. *International Journal of Electrochemical Science*. 6 (12), 5980–6010. doi.org/10.1002/wsb.762
- Kahlon, R. S. (2016). *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. India: Springer International Publishing AG Switzerland.
- Khan, M. & Ahmas, M. (2006). Detoxification and bioremediation potential of a *Pseudomonas fluorescens* isolate against the Major Indian water pollutants. *Journal of Environmental Science and Health Part A*. 41(4), 659–674. doi.org/10.1080/10934520600575051
- Klapcinska, B. (1994). Binding of germanium and lead to *Pseudomonas putida* lipopolysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology*. 40(8), 686–690. doi.org/10.1139/m94-109
- Klapcinska, B. & Chmielowski, J. (1986). Binding of germanium to *Pseudomonas putida* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 1144-1147.
- Knobelsdorf, M. J. (2005). *Eliminación biológica de nutrientes en un ARU de baja carga orgánica mediante el proceso VIP*. (Tesis de doctorado). Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona, España.
- Kiely, G. (1999). *Ingeniería Ambiental*. Madrid: McGraw-Hill.

- Konig, A., Pernyeszi, T., Kocsis, B. & Hegedusova, A. (2011). Bioadsorption of lead (II) and cadmium (II) ions onto the lyophilized cell surface of *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous suspension. *Agriculture and Environment*. 3, 5-17.
- Lacal, J. (2008). *Caracterización Bioquímica y Molecular del Sistema de Dos componentes TODS/TODT de Pseudomonas putida DOT-T1E*. (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, Granada, España.
- Leyva, R., Sánchez, M., Hernández, M. & Guerrero, R. (2001). Remoción de metales pesados de solución acuosa por medio de clinoptilolitas naturales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 17(3), 129-136.
- Londoño, L., Londoño, P. & Muñoz, F. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145-153. [https://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://dx.doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153).
- López, F., Pujante, A., Ribarrocha, V. & Tapia, G. (1995). Macroinvertebrados y calidad de las aguas de la red de la provincia de Castellón. *Ecol.* 9, 71-108.
- López, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S. & García, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Publicación Científica*. 4(5), 82-90.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. & Clark, D. (2009). *Brock Biología de los microorganismos*. (12va edición) Madrid: Pearson Educación S.A.
- Marrero, J., Díaz, A. & Coto, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 41 (1), 67-78.
- Martínez, K., Souza, V., Bucio, L., Gómez, L. & Gutiérrez, M. (2013). Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta Toxicol Argnet*, 21(1), 33-49.
- Martínez, A. & Rodríguez, R. (2013). In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2): 595-605. doi.org/10.1590/S1517-83822013000200040
- Martínez, M. & García, M. (2012). Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 55-73.
- Méndez, D., Quintero, J., Váquiro, H. & Solanilla, J. (2014). Alginato de sodio en el desarrollo de películas comestibles. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 5(2): 089-113.
- Mendoza, J., Perea, Y., Pretelin, C., Silveti, A., Martínez, M., Pérez, G., Espinoza, B. & Arriola, J. (2010). Biosorción de cromo, arsénico y plomo de soluciones

- acuosas por cultivos bacterianos en suspensión. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 1 (2): 67-73.
- Ministerio de Energía y minas del Perú (2017). *Anuario minero 2016*. Lima: Ministerio de Energía y minas del Perú.
- Mollinedo, M. & Gonzales, C. (2014). Bacterias Gram Negativas. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 49, 2609-2613.
- Moore, E., Tindall, B., Martins Dos Santos, V., Pieper, D., Ramos, J. & Palleroni, N. (2006). Nonmedical: *Pseudomonas*. *The Prokaryotes*. 6, 646-703. doi.org/10.1007/0-387-30746-X_21
- Morris, E., Rees, D., Thom, D. & Boyd, J. (1978). Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerization process in alginate gelation. *Carbohydrate Research*, 66 (1), 145-154.
- Muñoz, M. A. (2012). *Biotecnología*. (2nd ed.) Buenos Aires: Universidad Nacional de Quilmes.
- Navarro, J., Aguilar, I. & López, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas, *Valencia. Ecosistemas*. 16(2): 10-25.
- Ordoñez, J. (2011). ¿Qué es cuenca hidrológica?. Recuperado de https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-_delimitacion_y_caracterizacion_de_la_cuenca_del_rio_anzulon_1.pdf
- Organización Mundial de la Salud (2013), Guía breve de métodos analíticos para determinar la concentración de plomo en la sangre. Ginebra: OMS.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2009). *¿Por qué invertir en ordenación de las cuencas hidrográficas?*. Roma: FAO.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2007). *Más vale prevenir que lamentar. Las cuencas y la gestión del riesgo a los desastres naturales en Guatemala*. Guatemala: FAO.
- Organización Internacional del Trabajo. (1998). *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. Ginebra: Organización Internacional del Trabajo.
- Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería (2016). *Reporte de análisis económico sectorial-sector minería: mercado mundial, nacional, efectos derivados y visión de la minería*. Lima: Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería.
- Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería (2017). *La industria de la minería en el Perú: 20 años de contribución al crecimiento y desarrollo económico del país*. (1st ed.) Lima: Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería.

- Pabst, M., Miller, C., Dimkpa, C., Anderson, A. & Mclean, J. (2010). Defining the surface adsorption and internalization of copper and cadmium in a soil bacterium, *Pseudomonas putida*. *Chemosphere*, 81(7), 904-910.
- Pájaro, N., Maldonado, W., Pérez, N. & Díaz, J. (2013). Revisión de las implicaciones ocupacionales por exposición al plomo. *Informador Técnico*. 77(2), 183-91. doi.org/10.23850/22565035.58
- Palleroni, N., Kunisawa, R., Contopoulou, R., & Doudoroff, M. (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International journal of systematic bacteriology*. 23 (4), 333–339. doi.org/10.1099/00207713-23-4-333
- Palleroni, N. (1984). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237AL (nom. cons. Opin. 5, Jud. Comm. 1952, 237). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1, 141–199.
- Panigatti, M., Torres, J., Griffa, C., Boglione, R. & Gentinetta, F. (2007). Biorremediación de efluentes con cromo (VI) proveniente de plantas metalmeccánicas. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica*, 1 (2), 1-13.
- Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E. & Vega, M. (2003). Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas Putida*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 376(1), 26–32. doi.org/10.1007/s00216-003-1843-z
- Paré, L. & Gerez, P. (2012). Al filo del agua: cogestión de la subcuenca del río Pixquiac, Veracruz: UNAM.
- Pérez, A., Barraza, Z. & Martínez, D. (2015). Identificación de Bacterias Endófitas Resistentes a Plomo, Aisladas de Plantas de Arroz. *Agronomía Mesoamericana*. 26 (2), 267-276. doi.org/10.15517/am.v26i2.19281
- Pérez, P. & Azcona, M. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico Quirúrgicas*, 17(3), 199-205.
- Pérez, M., Dauntan, R., Contreras, A. & González, H. (2002). Remoción de nitrógeno y fósforo en aguas residuales utilizando un reactor discontinuo secuencial SBR. *XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Cancún*. 1, 1-8.
- Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (2010). *Análisis del flujo del comercio y revisión de prácticas de manejo ambientalmente racionales de productos conteniendo cadmio, plomo y mercurio en América Latina y el Caribe*. Madrid: PNUMA.
- Ramírez, V. (2002). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina*. 63 (1), 51–64. doi.org/10.15381/anales.v63i1.1477

- Ramírez, V. (2005). El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo. *Anales de la Facultad de Medicina*, 66, 57-70.
- Rathnayake, I., Megharaj, M., Krishnamurti, G., Bolan, N. & Naidu, R. (2013). Heavy metal toxicity to bacteria – Are the existing growth media accurate enough to determine heavy metal toxicity?. *Chemosphere*, 90, 1195-1200.
- Repetto, M. & Sanz, P. (1995). *Glosario De Términos Toxicológicos*. Sevilla: Asociación Española de Toxicología.
- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M. & González, E. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería Investigación y Desarrollo*. 16(2), 66-77. doi.org/10.19053/1900771X.v16.n2.2016.5447
- Rivera, H., Ítalo, J. & Casallo I. (2011). Geodisponibilidad de metales pesados en sedimentos de los ríos Supe y Pativilca. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 14 (27), 29-36.
- Rodríguez, H., Peña, M., Gutiérrez, A., González, C., Montes, S. & López, G. (2017). Biorremediación de arsénico mediada por microorganismos genéticamente modificados. *Terra Latinoamericana*, 35(4), 353-361. doi.org/10.28940/terra.v35i4.220
- Rosenthal, K. S. & Tan, M. J. (2010). *Rapid Review Microbiology and Immunology*. (3rd ed.) USA: Mosby.
- Ruíz, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos*. (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Sandoval, G. M. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1), 77-99.
- Shirdam, R., Khanafari, A. & Tabatabaee, A. (2006). Cadmium, nickel and vanadium accumulation by three strains of marine bacteria. *Iranian Journal of Biotechnology*, 4(3), 180-187.
- Singh, N. & Gadi, R. (2012). Studies on biosorption of Pb (II) by the nonliving biomasses of *Pseudomonas oleovorans* and *Brevundimonas vesicularis* and its removal from wastewater samples. *European Journal of Scientific Research*. 69(2), 279-289.
- Spain, A. (2003). Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. *Reviews in Undergraduate Research*, 2, 1-6.

- Suarez, P. & Reyes, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*, 27(4), 160-164.
- Sunar, N., Empanan, Gani, P. & Leman, A. (2016). Survival of *Pseudomonas putida* as bioremediation agent in soil contaminated with biodiesel-diesel mixture (b50) blends. *Engineering and Applied Sciences*. 11(11), 7279-7283.
- Susithra, S., Banu, H., Lucky, R. & Dawood A. (2009). Biodegradation of nutrient rich tannery effluent using cell suspension of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Pollution Control*, 25(2), 149-154.
- Tur, E., Orberá, T., Romagosa, Y. & Pérez, R. (2013). Bioadsorción de plomo (II) por biomasa microbiana seca: Efecto del pH. *Revista Cubana de Química*, 25(1), 75-81.
- Ueshima, M., Ginn, B., Haack, E., Szymanowski, J. & Fein, J. (2008). Cd adsorption onto *Pseudomonas putida* in the presence and absence of extracellular polymeric substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 72: 5885-5895.
- Valdez, E. & Vázquez, A. (2003). *Ingeniería de los sistemas de tratamiento y disposición de aguas residuales*. México: Fundación ICA.
- Vargas, T. & Kuno, A. (2014). Morfología Bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 49, 2594-2598.
- Venegas, C. B. (2015). *Eliminación biológica de nutrientes en aguas residuales con alto contenido de nitrógeno amoniacal utilizando un reactor biológico secuencial*. (Tesis de grado). Universidad de Cantabria, Santander, Colombia.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation: An overview. *Journal of Applied Chemistry*. 73 (7), 1163-1172. doi.org/10.1351/pac200173071163
- Vullo, D. (2003). Microorganismos y Metales Pesados, una Interacción en Beneficio del Medio Ambiente. *Química Viva*, 2(3), 93-104.
- Wasi, S., Tabrez, S. & Ahmad, M. (2013). Use of *Pseudomonas spp.* for the bioremediation of environmental pollutants: a review. *Environ Monit Assess*. 185(10), 8147-8155.
- Wetzel, R. (1981). *Limnología*. Barcelona: Omega.
- Woese, C., Stackebrandt, E., Weisburg, W., Paster, B., Madigan, M., Fowler, V., Hahn, C., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K. & Fox, G. (1984). The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology*. 5(3), 315-26. [doi.org/10.1016/S0723-2020\(84\)80034-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(84)80034-X)

TERMINOLOGÍA

Absorción (biológica). Proceso de entrada o transporte, activo o pasivo, de una sustancia al interior de un organismo (Repetto & Sanz, 1995).

Aerobio. Un organismo que crece en presencia de oxígeno; puede ser facultativo, obligado o microaerófilo (Madigan et al., 2009).

Autoclave. Un aparato esterilizador que destruye los microorganismos con temperatura, vapor de agua y condiciones bajo presión (Madigan et al., 2009).

Biorremediación. Utilización de los microorganismos para eliminar o detoxificar sustancias químicas tóxicas o indeseables del ambiente (Madigan et al., 2009).

Bioacumulación. Acumulación en un organismo de una sustancia química presente en el medioambiente. Esta sustancia química se acumula en los tejidos del organismo en concentraciones más altas que las presentes en el medio ambiente (sinónimo: bioconcentración). Esta acumulación se observa también a lo largo de la cadena trófica (presa-depredador) presentando los mayores niveles de contaminación las especies situadas en lo más alto de esta cadena (carnívoros) (Azpiroz et al., 2007).

Biotecnología. Utilización de uno o varios organismos, comúnmente modificados genéticamente, para llevar a cabo procesos químicos concretos destinados a la aplicación industrial, médica o agricultura (Madigan et al., 2009).

Biotransformación. Cualquier transformación química de una sustancia producida por organismos vivos o por preparaciones obtenidas de estos (Repetto y Sanz, 1995).

Célula. Unidad fundamental de la materia viva (Madigan et al., 2009).

Cepa. Población de células de una sola especie descendientes de una única célula; un clon (Madigan et al., 2009).

Citoplasma. Porción fluida de una célula limitada por la membrana celular exceptuando el núcleo (si existe) (Madigan et al., 2009).

Contaminación del agua. Presencia en el agua de materiales dañinos e inaceptables originados en alcantarillas, usos industriales, y el agua de escorrentía, en concentraciones suficientes que la convierten en no apta para su uso o para la vida acuática (Azpiroz et al., 2007).

Crecimiento bacteriano. Incremento en el número de células (Madigan et al., 2009).

Cultivo. Una cepa o diferentes tipos de microorganismos que se desarrollan bajo condiciones de laboratorio (Madigan et al., 2009).

Descontaminación. Tratamiento que hace que un objeto o superficie inanimada sea manipulable sin riesgo (Madigan et al., 2009).

Enzima. Una proteína que tiene la capacidad de acelerar (catalizar) una reacción química específica (Madigan et al., 2009).

Especie. En microbiología, una colección de cepas que comparten un gran número de propiedades importantes pero difieren en una o más propiedades significativas de otras colecciones de cepas (Madigan et al., 2009).

Estándares de calidad ambiental. Concentraciones de una sustancia que no deberían superarse en un sistema ambiental, a menudo expresadas como medias ponderadas en el tiempo, para períodos determinados (Repetto y Sanz, 1995).

Ecotoxicología. Estudio de los efectos tóxicos de los agentes físicos y químicos sobre las poblaciones y comunidades de los ecosistemas; abarca las formas de transferencia de estos agentes y sus interacciones con el ambiente (Repetto y Sanz, 1995).

Género. Grupo taxonómico relacionado con las especies (Madigan et al., 2009).

Inmovilización. Se refiere a células y enzimas físicamente confinadas o localizadas en una cierta región definida en el espacio reteniendo sus propiedades y actividades catalíticas. Asimismo, dependiendo del tipo de inmovilización tanto las células como las enzimas pueden ser inmovilizadas de forma permanente o temporal para ser utilizadas repetida y continuamente en diversos procesos químicos (Fajardo, Osuna, Velázquez, Escalante & Ibarra, 2011).

Inhibición. La reducción del crecimiento microbiano debido a un descenso en el número de microorganismos presentes o alteraciones en el ambiente microbiano (Madigan et al., 2009).

Inóculo: Material celular utilizado para iniciar un cultivo microbiano (Madigan et al., 2009).

Medio de cultivo. Una solución acuosa de varios nutrientes que permite el crecimiento de los microorganismos (Madigan et al., 2009).

Membrana externa. Forma parte de la pared de las bacterias gram negativas, se sitúa por encima del peptidoglicano y está constituida por una bicapa lipídica de fosfolípidos y lipopolisacárido y otras proteínas (Madigan et al., 2009).

Mesófilo. Un organismo que crece mejor a temperaturas entre 20 °C y 45 °C (Madigan et al., 2009).

Metabolismo. Suma de todos los procesos químicos y físicos que tienen lugar en un organismo; en sentido más estricto, cambios físicos y químicos que sufre una sustancia en un organismo. Incluye la incorporación y distribución en el organismo de los componentes químicos, los cambios (biotransformaciones sufridas) y la eliminación de los compuestos y de sus metabolitos (Azpiroz et al., 2007).

Microorganismo. Organismo microscópico constituido por una sola célula o varias, incluyendo los virus (Madigan et al., 2009).

Procariota. Célula que carece de un núcleo delimitado por una membrana nuclear y de otros orgánulos (Madigan et al., 2009).

Proteína. Un polipéptido o grupo de polipéptidos que forman una molécula con una función biológica específica (Madigan et al., 2009).

Tinción de Gram. Técnica de tinción diferencial en el que las células se tiñen bien de rosa (gramnegativos), bien de azul (grampositivos), en función de sus características estructurales de la pared (Madigan et al., 2009).

Tóxico. Cualquier agente químico o físico capaz de producir un efecto adverso para la salud. Todos los agentes físicos y químicos son tóxicos potenciales, ya que su acción depende de la dosis y de las circunstancias individuales y ambientales (Repetto y Sanz, 1995).

Xenobiótico. En sentido estricto, cualquier sustancia que interactúa con un organismo y que no es uno de sus componentes naturales. Sin. Sustancias exógena, sustancia extraña (Repetto y Sanz, 1995).

APÉNDICES

Apéndice 1. Descripción de nitrógeno total

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Tiempo 1	4	,1050	,00577	,00289	,0958	,1142	,10	,11
Tiempo 2	4	,6925	,01708	,00854	,6653	,7197	,67	,71
Tiempo 3	4	1,0275	,01708	,00854	1,0003	1,0547	1,01	1,05
Tiempo 4	4	2,1200	,07874	,03937	1,9947	2,2453	2,01	2,19
Tiempo 5	4	,4150	,07416	,03708	,2970	,5330	,32	,50
Total	20	,8720	,71382	,15961	,5379	1,2061	,10	2,19

Apéndice 2. Prueba de homogeneidad de varianzas de nitrógeno total

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,464	4	15	,090

Apéndice 3. Análisis de varianzas (ANOVA) para la concentración de nitrógeno total

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	9,644	4	2,411	978,772	,000
Intra-grupos	,037	15	,002		
Total	9,681	19			

Apéndice 4. Comparaciones múltiples de HSD de TUKEY para nitrógeno total

(I) Horas	(J) Horas	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tiempo 1	Tiempo 2	-,58750	,03510	,000	-,6959	-,4791
	Tiempo 3	-,92250	,03510	,000	-1,0309	-,8141
	Tiempo 4	-2,01500	,03510	,000	-2,1234	-1,9066
	Tiempo 5	-,31000	,03510	,000	-,4184	-,2016
Tiempo 2	Tiempo 1	,58750	,03510	,000	,4791	,6959
	Tiempo 3	-,33500	,03510	,000	-,4434	-,2266
	Tiempo 4	-1,42750	,03510	,000	-1,5359	-1,3191
	Tiempo 5	,27750	,03510	,000	,1691	,3859
Tiempo 3	Tiempo 1	,92250	,03510	,000	,8141	1,0309
	Tiempo 2	,33500	,03510	,000	,2266	,4434
	Tiempo 4	-1,09250	,03510	,000	-1,2009	-,9841
	Tiempo 5	,61250	,03510	,000	,5041	,7209
Tiempo 4	Tiempo 1	2,01500	,03510	,000	1,9066	2,1234
	Tiempo 2	1,42750	,03510	,000	1,3191	1,5359
	Tiempo 3	1,09250	,03510	,000	,9841	1,2009
	Tiempo 5	1,70500	,03510	,000	1,5966	1,8134
Tiempo 5	Tiempo 1	,31000	,03510	,000	,2016	,4184
	Tiempo 2	-,27750	,03510	,000	-,3859	-,1691
	Tiempo 3	-,61250	,03510	,000	-,7209	-,5041
	Tiempo 4	-1,70500	,03510	,000	-1,8134	-1,5966

Apéndice 5. Prueba HSD de TUKEY para nitrógeno total

Horas	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
Tiempo 1	4	,1050				
Tiempo 5	4		,4150			
Tiempo 2	4			,6925		
Tiempo 3	4				1,0275	
Tiempo 4	4					2,1200
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4,000.

Apéndice 6. Descriptivos de fósforo total

N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
				Límite inferior	Límite superior			
Tiempo 1	4	,0325	,00500	,00250	,0245	,0405	,03	,04
Tiempo 2	4	,2475	,03403	,01702	,1933	,3017	,20	,28
Tiempo 3	4	,4475	,06185	,03092	,3491	,5459	,36	,50
Tiempo 4	4	,6475	,25552	,12776	,2409	1,0541	,44	1,00
Tiempo 5	4	,2325	,00957	,00479	,2173	,2477	,22	,24
Total	20	,3215	,23924	,05350	,2095	,4335	,03	1,00

Apéndice 7. Prueba de homogeneidad de varianzas de fósforo total

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
5,847	4	15	,005

Apéndice 8. Análisis de varianzas (ANOVA) para la concentración de fósforo total

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,876	4	,219	15,561	,000
Intra-grupos	,211	15	,014		
Total	1,087	19			

Apéndice 9. Comparación múltiple de HSD de TUKEY para fósforo total

(I) Horas	(J) Horas	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tiempo 1	Tiempo 2	-,58750	,03510	,000	-,6959	-,4791
	Tiempo 3	-,92250	,03510	,000	-1,0309	-,8141
	Tiempo 4	-2,01500	,03510	,000	-2,1234	-1,9066
	Tiempo 5	-,31000	,03510	,000	-,4184	-,2016
Tiempo 2	Tiempo 1	,58750	,03510	,000	,4791	,6959
	Tiempo 3	-,33500	,03510	,000	-,4434	-,2266
	Tiempo 4	-1,42750	,03510	,000	-1,5359	-1,3191
	Tiempo 5	,27750	,03510	,000	,1691	,3859
Tiempo 3	Tiempo 1	,92250	,03510	,000	,8141	1,0309
	Tiempo 2	,33500	,03510	,000	,2266	,4434
	Tiempo 4	-1,09250	,03510	,000	-1,2009	-,9841
	Tiempo 5	,61250	,03510	,000	,5041	,7209
Tiempo 4	Tiempo 1	2,01500	,03510	,000	1,9066	2,1234
	Tiempo 2	1,42750	,03510	,000	1,3191	1,5359
	Tiempo 3	1,09250	,03510	,000	,9841	1,2009
	Tiempo 5	1,70500	,03510	,000	1,5966	1,8134
Tiempo 5	Tiempo 1	,31000	,03510	,000	,2016	,4184
	Tiempo 2	-,27750	,03510	,000	-,3859	-,1691
	Tiempo 3	-,61250	,03510	,000	-,7209	-,5041
	Tiempo 4	-1,70500	,03510	,000	-1,8134	-1,5966

Apéndice 10. Prueba HSD de TUKEY para fósforo total

Horas	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Tiempo 1	4	,0325		
Tiempo 5	4	,2325	,2325	
Tiempo 2	4	,2475	,2475	
Tiempo 3	4		,4475	,4475
Tiempo 4	4			,6475
Sig.		,128	,128	,173

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000.

Apéndice 11. Descriptivos de pH

N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
				Límite inferior	Límite superior			
Tiempo 1	4	7,5100	,00816	,00408	7,4970	7,5230	7,50	7,52
Tiempo 2	4	7,4225	,02062	,01031	7,3897	7,4553	7,40	7,45
Tiempo 3	4	7,5775	,02062	,01031	7,5447	7,6103	7,55	7,60
Tiempo 4	4	7,5425	,03096	,01548	7,4932	7,5918	7,50	7,57
Tiempo 5	4	7,5250	,03416	,01708	7,4706	7,5794	7,49	7,57
Total	20	7,5155	,05735	,01282	7,4887	7,5423	7,40	7,60

Apéndice 12. Prueba de homogeneidad de varianzas de pH

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,277	4	15	,322

Apéndice 13. Análisis de varianzas (ANOVA) para pH

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,053	4	,013	21,933	,000
Intra-grupos	,009	15	,001		
Total	,062	19			

Apéndice 14. Comparación múltiple de HSD de TUKEY para pH

(I) Horas	(J) Horas	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tiempo 1	Tiempo 2	,08750	,01744	,001	,0336	,1414
	Tiempo 3	-,06750	,01744	,011	-,1214	-,0136
	Tiempo 4	-,03250	,01744	,377	-,0864	,0214
	Tiempo 5	-,01500	,01744	,907	-,0689	,0389
Tiempo 2	Tiempo 1	-,08750	,01744	,001	-,1414	-,0336
	Tiempo 3	-,15500	,01744	,000	-,2089	-,1011
	Tiempo 4	-,12000	,01744	,000	-,1739	-,0661
	Tiempo 5	-,10250	,01744	,000	-,1564	-,0486
Tiempo 3	Tiempo 1	,06750	,01744	,011	,0136	,1214
	Tiempo 2	,15500	,01744	,000	,1011	,2089
	Tiempo 4	,03500	,01744	,309	-,0189	,0889
	Tiempo 5	,05250	,01744	,058	-,0014	,1064
Tiempo 4	Tiempo 1	,03250	,01744	,377	-,0214	,0864
	Tiempo 2	,12000	,01744	,000	,0661	,1739
	Tiempo 3	-,03500	,01744	,309	-,0889	,0189
	Tiempo 5	,01750	,01744	,850	-,0364	,0714
Tiempo 5	Tiempo 1	,01500	,01744	,907	-,0389	,0689
	Tiempo 2	,10250	,01744	,000	,0486	,1564
	Tiempo 3	-,05250	,01744	,058	-,1064	,0014
	Tiempo 4	-,01750	,01744	,850	-,0714	,0364

Apéndice 15. Prueba HSD de TUKEY para pH

Horas	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
Tiempo 2	4	7,4225		
Tiempo 1	4		7,5100	
Tiempo 5	4		7,5250	7,5250
Tiempo 4	4		7,5425	7,5425
Tiempo 3	4			7,5775
Sig.		1,000	,377	,058

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4,000.

Apéndice 16. Descriptivos de conductividad

N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
				Límite inferior	Límite superior			
Tiempo 1	4	1300,0000	,00000	,00000	1300,0000	1300,0000	1300,00	1300,00
Tiempo 2	4	2450,0000	129,09944	64,54972	2244,5740	2655,4260	2300,00	2600,00
Tiempo 3	4	1625,0000	95,74271	47,87136	1472,6520	1777,3480	1500,00	1700,00
Tiempo 4	4	1500,0000	216,02469	108,01234	1156,2565	1843,7435	1200,00	1700,00
Tiempo 5	4	500,0000	216,02469	108,01234	156,2565	843,7435	300,00	800,00
Total	20	1475,0000	656,04477	146,69607	1167,9616	1782,0384	300,00	2600,00

Apéndice 17. Prueba de homogeneidad de varianzas de conductividad

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,022	4	15	,143

Apéndice 18. Análisis de varianzas (ANOVA) para conductividad

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7820000,000	4	1955000,000	82,028	,000
Intra-grupos	357500,000	15	23833,333		
Total	8177500,000	19			

Apéndice 19. Comparaciones múltiples de HSD de TUKEY conductividad

(I) Horas	(J) Horas	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tiempo 1	Tiempo 2	-1150,00000	109,16349	,000	-1487,0886	-812,9114
	Tiempo 3	-325,00000	109,16349	,061	-662,0886	12,0886
	Tiempo 4	-200,00000	109,16349	,392	-537,0886	137,0886
	Tiempo 5	800,00000	109,16349	,000	462,9114	1137,0886
Tiempo 2	Tiempo 1	1150,00000	109,16349	,000	812,9114	1487,0886
	Tiempo 3	825,00000	109,16349	,000	487,9114	1162,0886
	Tiempo 4	950,00000	109,16349	,000	612,9114	1287,0886
	Tiempo 5	1950,00000	109,16349	,000	1612,9114	2287,0886
Tiempo 3	Tiempo 1	325,00000	109,16349	,061	-12,0886	662,0886
	Tiempo 2	-825,00000	109,16349	,000	-1162,0886	-487,9114
	Tiempo 4	125,00000	109,16349	,781	-212,0886	462,0886
	Tiempo 5	1125,00000	109,16349	,000	787,9114	1462,0886
Tiempo 4	Tiempo 1	200,00000	109,16349	,392	-137,0886	537,0886
	Tiempo 2	-950,00000	109,16349	,000	-1287,0886	-612,9114
	Tiempo 3	-125,00000	109,16349	,781	-462,0886	212,0886
	Tiempo 5	1000,00000	109,16349	,000	662,9114	1337,0886
Tiempo 5	Tiempo 1	-800,00000	109,16349	,000	-1137,0886	-462,9114
	Tiempo 2	-1950,00000	109,16349	,000	-2287,0886	-1612,9114
	Tiempo 3	-1125,00000	109,16349	,000	-1462,0886	-787,9114
	Tiempo 4	-1000,00000	109,16349	,000	-1337,0886	-662,9114

Apéndice 20. Prueba HSD de TUKEY para conductividad

Horas	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
Tiempo 5	4	500,0000		
Tiempo 1	4		1300,0000	
Tiempo 4	4		1500,0000	
Tiempo 3	4		1625,0000	
Tiempo 2	4			2450,0000
Sig.		1,000	,061	1,000

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4,000.

Apéndice 21. Descriptivos de cadmio

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					Tiempo 1	4		
Tiempo 2	4	,1225	,01893	,00946	,0924	,1526	,11	,15
Tiempo 3	4	,0900	,00816	,00408	,0770	,1030	,08	,10
Tiempo 4	4	,0625	,01500	,00750	,0386	,0864	,05	,08
Tiempo 5	4	,0500	,00816	,00408	,0370	,0630	,04	,06
Total	20	,3850	,62390	,13951	,0930	,6770	,04	1,60

Apéndice 22. Prueba de homogeneidad de varianzas de cadmio

Estadístico de Levene	g1	g2	Sig.
3.495	4	15	,033

Apéndice 23. Análisis de varianzas (ANOVA) para la concentración de cadmio

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7,394	4	1,848	12895,727	,000
Intra-grupos	,002	15	,000		
Total	7,396	19			

Apéndice 24. Comparación múltiple de HSD de TUKEY para cadmio

(I) Horas	(J) Horas	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tiempo 1	Tiempo 2	1,47750	,00847	,000	1,4514	1,5036
	Tiempo 3	1,51000	,00847	,000	1,4839	1,5361
	Tiempo 4	1,53750	,00847	,000	1,5114	1,5636
	Tiempo 5	1,55000	,00847	,000	1,5239	1,5761
Tiempo 2	Tiempo 1	-1,47750	,00847	,000	-1,5036	-1,4514
	Tiempo 3	,03250	,00847	,012	,0064	,0586
	Tiempo 4	,06000	,00847	,000	,0339	,0861
	Tiempo 5	,07250	,00847	,000	,0464	,0986
Tiempo 3	Tiempo 1	-1,51000	,00847	,000	-1,5361	-1,4839
	Tiempo 2	-,03250	,00847	,012	-,0586	-,0064
	Tiempo 4	,02750	,00847	,037	,0014	,0536
	Tiempo 5	,04000	,00847	,002	,0139	,0661
Tiempo 4	Tiempo 1	-1,53750	,00847	,000	-1,5636	-1,5114
	Tiempo 2	-,06000	,00847	,000	-,0861	-,0339
	Tiempo 3	-,02750	,00847	,037	-,0536	-,0014
	Tiempo 5	,01250	,00847	,592	-,0136	,0386
Tiempo 5	Tiempo 1	-1,55000	,00847	,000	-1,5761	-1,5239
	Tiempo 2	-,07250	,00847	,000	-,0986	-,0464
	Tiempo 3	-,04000	,00847	,002	-,0661	-,0139
	Tiempo 4	-,01250	,00847	,592	-,0386	,0136

Apéndice 25. Prueba HSD de TUKEY para cadmio

Horas	N	Subconjunto para alfa = 0,05			
		1	2	3	4
Tiempo 5	4	,0500			
Tiempo 4	4	,0625			
Tiempo 3	4		,0900		
Tiempo 2	4			,1225	
Tiempo 1	4				1,6000
Sig.		,592	1,000	1,000	1,000

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4,000.

Apéndice 26. Descriptivos de plomo

N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
				Límite inferior	Límite superior			
				Tiempo 1	4			2,7675
Tiempo 2	4	,5050	,18947	,09474	,2035	,8065	,24	,69
Tiempo 3	4	,8250	,11387	,05694	,6438	1,0062	,73	,99
Tiempo 4	4	1,1025	,33856	,16928	,5638	1,6412	,87	1,60
Tiempo 5	4	,7975	,02872	,01436	,7518	,8432	,76	,83
Total	20	1,1995	,84299	,18850	,8050	1,5940	,24	2,77

Apéndice 27. Prueba de homogeneidad de varianzas de plomo

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
4,023	4	15	,021

Apéndice 28. Análisis de varianzas (ANOVA) para la concentración de plomo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
Inter-grupos	13,009	4	3,252	98,947	,000	
Intra-grupos	,493	15	,033			
Total	13,502	19				

Apéndice 29. Comparaciones múltiples de HSD de TUKEY para plomo

(I) Horas	(J) Horas	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tiempo 1	Tiempo 2	2,26250	,12820	,000	1,8666	2,6584
	Tiempo 3	1,94250	,12820	,000	1,5466	2,3384
	Tiempo 4	1,66500	,12820	,000	1,2691	2,0609
	Tiempo 5	1,97000	,12820	,000	1,5741	2,3659
Tiempo 2	Tiempo 1	-2,26250	,12820	,000	-2,6584	-1,8666
	Tiempo 3	-,32000	,12820	,144	-,7159	,0759
	Tiempo 4	-,59750	,12820	,002	-,9934	-,2016
	Tiempo 5	-,29250	,12820	,204	-,6884	,1034
Tiempo 3	Tiempo 1	-1,94250	,12820	,000	-2,3384	-1,5466
	Tiempo 2	,32000	,12820	,144	-,0759	,7159
	Tiempo 4	-,27750	,12820	,245	-,6734	,1184
	Tiempo 5	,02750	,12820	,999	-,3684	,4234
Tiempo 4	Tiempo 1	-1,66500	,12820	,000	-2,0609	-1,2691
	Tiempo 2	,59750	,12820	,002	,2016	,9934
	Tiempo 3	,27750	,12820	,245	-,1184	,6734
	Tiempo 5	,30500	,12820	,175	-,0909	,7009
Tiempo 5	Tiempo 1	-1,97000	,12820	,000	-2,3659	-1,5741
	Tiempo 2	,29250	,12820	,204	-,1034	,6884
	Tiempo 3	-,02750	,12820	,999	-,4234	,3684
	Tiempo 4	-,30500	,12820	,175	-,7009	,0909

Apéndice 30. Prueba HSD de TUKEY para plomo

Horas	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
Tiempo 2	4	,5050		
Tiempo 5	4	,7975	,7975	
Tiempo 3	4	,8250	,8250	
Tiempo 4	4		1,1025	
Tiempo 1	4			2,7675
Sig.		,144	,175	1,000

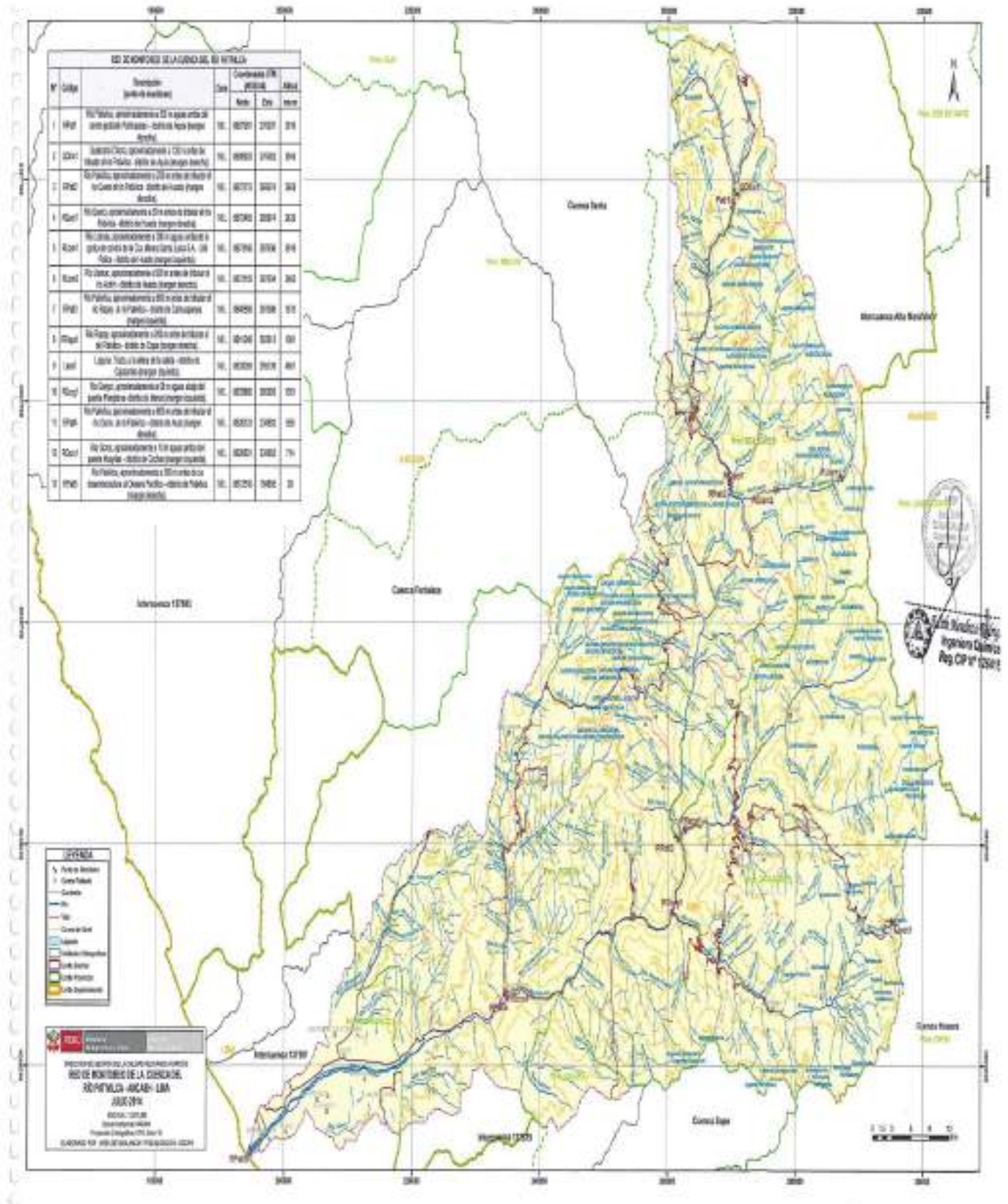
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4,000.

Apéndice 31. Resultado de monitoreo de Autoridad Local del Agua de Barranca-ANA en 2014

FECHA(S) Y HORA (S) DE MONITOREO				24/03/2014	24/03/2014	25/03/2014	25/03/2014	25/03/2014	25/03/2014	26/03/2014	26/03/2014	27/03/2014	27/03/2014	27/03/2014	28/03/2014	28/03/2014
				16:06	17:40	09:00	09:48	11:45	14:22	10:15	10:55	10:30	15:40	10:00	10:50	15:07
PARÁMETROS	Unidades	ECA Categoría 3	ECA Categoría 4	RPati1	QChic1	RPati2	RQuer1	RLIam1	RLIam2	RPati3	RRapa1	LToct1	RGorg1	RPati4	ROcro1	RPati5
PARÁMETROS FÍSICOS																
pH	UNT	6.5-8.4	6.5-8.5	8,25	6,41	8,26	7,83	8,55	8,62	8,26	8,33	8,34	8,05	8,12	7,95	8,16
Oxígeno disuelto (O ₂)	mg/L	>=4	>=5	6,98	8,26	8,31	8,18	6,35	7,52	10,06	10,87	4,67	10,46	12,26	11,18	12,05
PARÁMETROS QUÍMICOS																
Alcalinidad (al carbonat)	CaCO ₃ mg/L	5	—	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	9,66	6,84	<1.00	<1.00	—	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
Nitrógeno Amoniacal	NH ₄ ⁺ -N mg/L	—	<0,02	—	—	—	—	—	—	—	—	0,027	—	—	—	—
Aluminio total (Al tot)	mg/L	5	—	0,93	0,18	0,55	1,70	0,10	0,18	11,04	1,31	0,03	2,20	19,65	0,81	24,45
Arsénico total (As tot)	mg/L	0,05	0,01	<0,001	0,003	0,002	0,069	<0,001	<0,001	0,018	0,009	<0,001	0,004	0,021	0,003	0,029
Cadmio total (Cd tot)	mg/L	0,005	0,004	<0,0004	<0,0004	<0,0004	0,0004	<0,0004	<0,0004	0,0031	<0,0004	<0,0004	0,0004	0,0043	<0,0004	0,0051
Hierro total (Fe tot)	mg/L	1	—	1,126	0,311	0,922	4,967	0,149	0,271	21,438	2,020	0,281	2,673	28,983	0,970	34,508
Litio total (Li tot)	mg/L	2,5	—	<0,003	<0,003	0,007	0,008	<0,003	0,003	0,034	0,048	<0,003	0,011	0,044	<0,003	0,053
Manganeso total (Mn tot)	mg/L	0,2	—	0,2063	0,2231	0,0949	0,1239	0,0170	0,0242	0,3675	0,0707	0,0207	0,1463	1,1983	0,0417	1,2745
Plomo total (Pb tot)	mg/L	0,05	0,001	<0,0004	0,0018	0,0049	0,0242	0,0005	0,0014	0,0272	0,0023	0,0012	0,0046	0,0464	0,0032	0,0559
PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS Y PARASITOLÓGICOS																
Coliformes termotolerantes	NMP/100mL	1000	1000	4,5	23	28000	330	<1.8	110	490	130	<1.8	230	330	330	3300

Apéndice 32. Mapa de puntos de monitoreo de Autoridad Local del Agua de Barranca-ANA en 2014



Apéndice 33. Parámetros físico-químico de la categoría 3 de D.S.004-2017-MINAM
(Estándares de Calidad de Agua)

Parámetros	Unidad de medida	D1: Riego de vegetales		D2: Bebida de animales
		Agua para riego no restringido (c)	Agua para riego restringido	Bebida de animales
FÍSICOS- QUÍMICOS				
Aceites y Grasas	mg/L	5		10
Bicarbonatos	mg/L	518		**
Cianuro Wad	mg/L	0,1		0,1
Cloruros	mg/L	500		**
Color (b)	Color verdadero Escala Pt/Co	100 (a)		100 (a)
Conductividad	(μ S/cm)	2 500		5 000
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	mg/L	15		15
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg/L	40		40
Detergentes (SAAM)	mg/L	0,2		0,5
Fenoles	mg/L	0,002		0,01
Fluoruros	mg/L	1		**
Nitratos (NO ₃ ⁻ -N) + Nitritos (NO ₂ ⁻ -N)	mg/L	100		100
Nitritos (NO ₂ ⁻ -N)	mg/L	10		10
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	≥ 4		≥ 5
Potencial de Hidrógeno (pH)	Unidad de pH	6,5 – 8,5		6,5 – 8,4
Sulfatos	mg/L	1 000		1 000
Temperatura	°C	Δ 3		Δ 3
INORGÁNICOS				
Aluminio	mg/L	5		5

Apéndice 34. Parámetros de metales DE LA categoría 3 DE D.S.004-2017-MINAM
(Estándares de Calidad de Agua)

Parámetros	Unidad de medida	D1: Riego de vegetales		D2: Bebida de animales
		Agua para riego no restringido (c)	Agua para riego restringido	Bebida de animales
Arsénico	mg/L	0,1		0,2
Bario	mg/L	0,7		**
Berilio	mg/L	0,1		0,1
Boro	mg/L	1		5
Cadmio	mg/L	0,01		0,05
Cobre	mg/L	0,2		0,5
Cobalto	mg/L	0,05		1
Cromo Total	mg/L	0,1		1
Hierro	mg/L	5		**
Litio	mg/L	2,5		2,5
Magnesio	mg/L	**		250
Manganeso	mg/L	0,2		0,2
Mercurio	mg/L	0,001		0,01
Níquel	mg/L	0,2		1
Plomo	mg/L	0,05		0,05
Selenio	mg/L	0,02		0,05
Zinc	mg/L	2		24

Apéndice 35. Registro fotográfico de la investigación

(a) Área de la extracción de la muestra del Río Pativilca. (b) Extracción de la muestra.



Plaqueo del agar King B



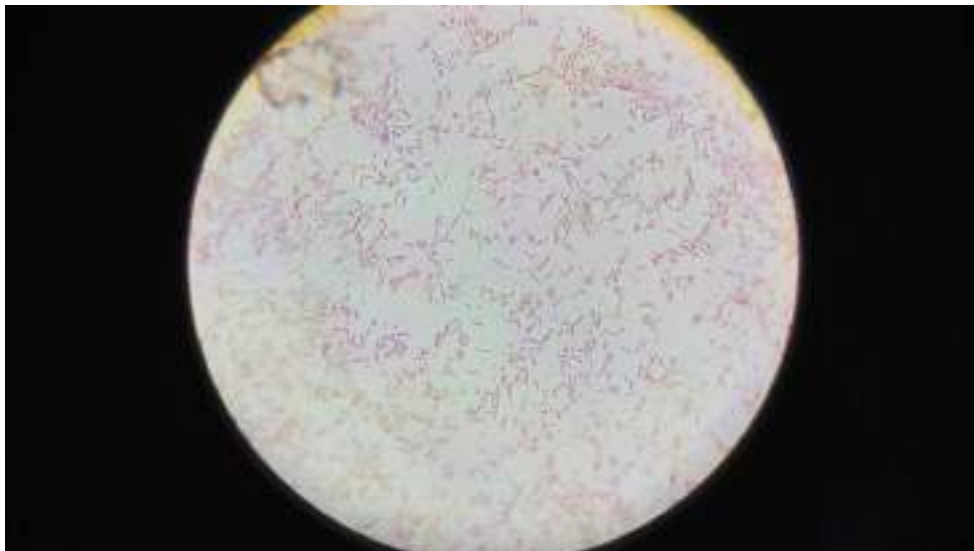
Cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* ATCC 49128.



Sembrado de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en las placas Petri con Agar King B.



Observación bajo microscopio a la cepa bacteriana de la *Pseudomonas Putida* ATCC 49128.



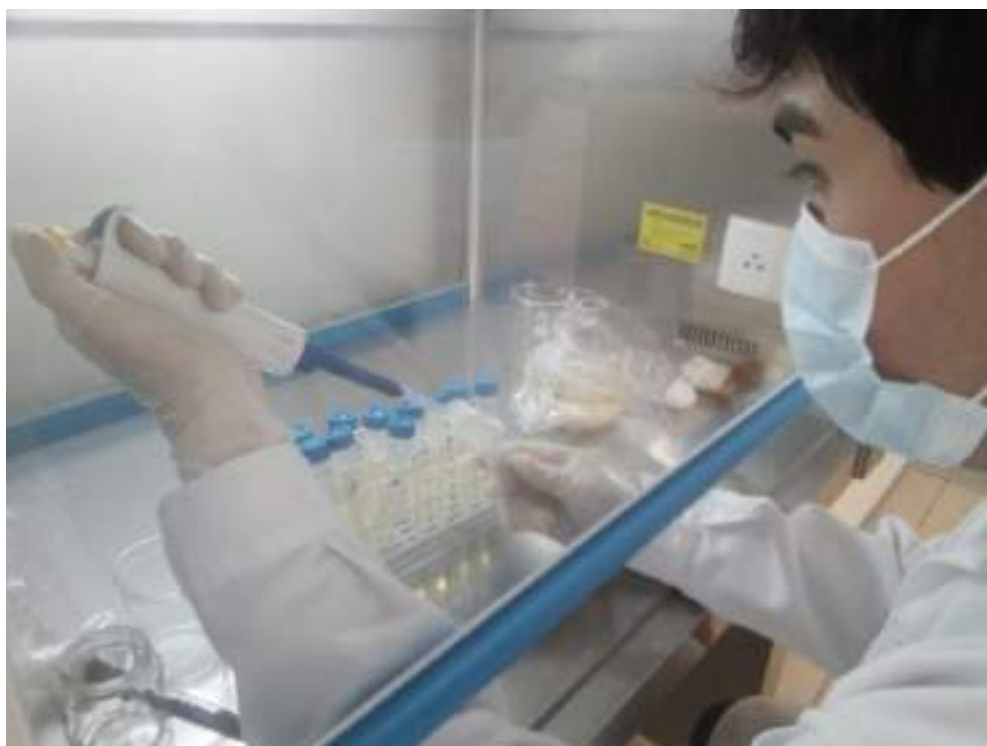
Matraz con medio de cultivo de caldo tripticasa de soya.



Matraces con medio de cultivo de caldo tripticasa de soya de concentración inicial de 0,1 mg/ml de plomo y cadmio.



Inoculación de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en medio de cultivo de caldo tripticasa de soya con plomo y cadmio.



Placa Petri con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas en plomo y cadmio.



Formación de perlas o esferas de alginato de calcio al 4 % con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en solución de cloruro de calcio de 0,05M.



Unidades de tratamiento.



Perlas o esferas de alginato de calcio con *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas.

