

UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA



Evaluación del efecto de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en la
reducción de la Demanda Bioquímica de Oxígeno de efluentes de la
PTAR Collique, Comas

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AMBIENTAL**

AUTOR

Daimer Ely Bazán Suárez

ASESOR

Armando Chiclla Salazar

Lima, Perú

2022

METADATOS COMPLEMENTARIOS

Datos del autor

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	
Número de Orcid (opcional)	

Datos del asesor

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	
Número de Orcid (obligatorio)	

Datos del Jurado

Datos del presidente del jurado

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	

Datos del segundo miembro

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	

Datos del tercer miembro

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	

Datos de la obra

Materia*	
Campo del conocimiento OCDE Consultar el listado:	
Idioma (Normal ISO 639-3)	
Tipo de trabajo de investigación	
País de publicación	
Recurso del cual forma parte (opcional)	
Nombre del grado	
Grado académico o título profesional	
Nombre del programa	
Código del programa Consultar el listado:	

*Ingresar las palabras clave o términos del lenguaje natural (no controladas por un vocabulario o tesoro).

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA N° 032 - 2022/UCSS/FIA/DI

Siendo las 05:30 m. del día 12 de octubre de 2022 - Universidad Católica Sedes Sapientiae, el Jurado de Tesis, integrado por:

- | | |
|------------------------------------|-----------------|
| 1. Godofredo Román Lobato Calderón | presidente |
| 2. Manuel Antonio Trelles Velasco | primer Miembro |
| 3. José Miguel Vílchez Guerrero | segundo Miembro |
| 4. Armando Chiclla Salazar | asesor |

Se reunieron para la sustentación de la tesis titulada **Evaluación del efecto de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en la reducción de la Demanda Bioquímica de Oxígeno de efluentes de la PTAR Collique, Comas** que presenta el bachiller en Ciencias Ambientales, **Daimer Ely Bazán Suárez**, 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 y luego de deliberar, el Jurado acuerda:

APROBAR

DESAPROBAR

La tesis, con el calificativo de **MUY BUENA** 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.

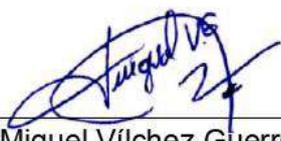
Lima, 12 de octubre de 2022.



Godofredo Román Lobato Calderón
PRESIDENTE



Manuel Antonio Trelles Velasco
1° MIEMBRO



José Miguel Vílchez Guerrero
2° MIEMBRO



Armando Chiclla Salazar
ASESOR

DEDICATORIA

*A Blas Bazán Sánchez y Rosita
Suárez Becerra, mis padres,
quienes desde su trinchera y a su
manera supieron darme su amor y
apoyo siempre.*

*También se lo dedico con mucho
cariño a mis hermanos Andres,
Cinthia, Ceci y Calín quienes en
innumerables ocasiones agregaron
sonrisas y fortaleza a mi vida.*

*A Jhobany Arrascue, mi tía, quien
con sus visitas y pláticas me
permitió conocer otras realidades
sin que yo hubiese salido de mi
pueblo, desde entonces forma
parte de mi vida y hace de ella una
experiencia afortunada y llena de
esperanza.*

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por su maravillosa obra, el universo y la vida; a mis padres por permitirme ser el fruto visible del amor que un día se tuvieron; agradezco a las innumerables circunstancias que me trajeron hasta aquí, en este camino y dirección, permitiéndome conocer seres humanos increíbles.

Agradezco al Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo (PRONABEC) y a la Universidad Católica Sede Sapientiae (UCSS), artífices de que haya tenido la oportunidad de estudiar una carrera profesional y de modo crucial, cambiar mi vida para bien.

Le estoy muy agradecido al Blgo. Armando Chiclla Salazar, mi asesor, quien tuvo la predisposición para guiarme con sus conocimientos y experiencia, y contribuir a que el presente trabajo de tesis sea una realidad.

También agradezco al Ing. José Víctor Ruíz Ccance, por su tiempo y por su apoyo en los cursos de seminario de investigación.

A la Blga. Teresa Damaris Rebaza Cárdenas y al Bach. Denis Javier García Cortez, muchas gracias por toda la orientación y apoyo brindado en los trabajos de laboratorio.

Agradezco a la Municipalidad Distrital de Comas, por brindarme la autorización y las facilidades para el recojo de muestras utilizadas en el presente estudio.

Finalmente quiero agradecer de manera muy especial a mis amigos y compañeros Nelson Mori, Waldemar Rojas y Cesar Gutiérrez, con quienes compartí muy de cerca parte de mi experiencia universitaria en aquel apartamento, aunque en realidad fuimos cinco con mi hermano Andrés y en ocasiones más.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice general	vii
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
Índice de apéndices	xiii
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. Bases teóricas especializadas.....	11
1.2.1. Aguas residuales	11
a. Tipología de las aguas residuales según su origen.....	11
b. Las aguas residuales domésticas y sus características.....	12
1.2.2. Contaminación ambiental por aguas residuales domésticas	14
1.2.3. Depuración de las aguas residuales de origen doméstico	15
a. Infraestructuras y procesos de purificación de las aguas residuales	16
1.2.4. Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)	18
a. Implicancia de la DBO ₅ en la depuración de las aguas residuales	20
1.2.5. Otros parámetros de interés en la depuración de las aguas residuales	21
1.2.6. Las bacterias y sus características	24
1.2.7. El género <i>Pseudomonas</i>	27
a. <i>Pseudomonas putida</i>	30
1.2.8. La biorremediación como alternativa biotecnológica	32
a. Biorremediación por bioaugmentación de bacterias libres e inmovilizadas	33
1.2.9. Inmovilización bacteriana en los procesos de biorremediación	33
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.1. Diseño de la investigación.....	37
2.1.1. Lugar y fecha.....	37
2.1.2. Materiales	39

2.1.3. Descripción del experimento.....	42
2.1.4. Tratamientos.....	57
2.1.5. Unidades experimentales.....	58
2.1.6. Identificación de variables y su mensuración	59
2.1.7. Diseño estadístico del experimento	60
2.1.8. Análisis estadístico de datos.....	60
CAPÍTULO III: RESULTADOS	61
3.1. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 en condiciones de laboratorio	61
3.2. Características fisicoquímicas de los efluentes de la PTAR Collique, en contraste con los LMP para efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales	62
3.3. Variación de la demanda bioquímica de oxígeno de los efluentes de la PTAR Collique por efecto de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 inmovilizadas en espumas de poliuretano	64
3.4. Efectos sobre la DQO, pH, conductividad eléctrica y temperatura de los efluentes de la PTAR Collique, por influencia de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 inmovilizadas en espumas de poliuretano.....	68
CAPÍTULO IV: DISCUSIONES	77
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	87
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	89
REFERENCIAS	90
TERMINOLOGÍA	99
APÉNDICES	101

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. <i>Principales características de las aguas servidas</i>	13
Tabla 2. <i>Concentraciones típicas de contaminantes aportados por aguas residuales domésticas</i>	15
Tabla 3. <i>Límites Máximos Permisibles (LMP) para efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales (PTAR)</i>	16
Tabla 4. <i>Etapas de purificación de las aguas residuales, objetivos e infraestructuras tradicionales aplicables</i>	17
Tabla 5. <i>Taxonomía de Pseudomonas putida</i>	30
Tabla 6. <i>Descripción de los tratamientos experimentales</i>	58
Tabla 7. <i>Variables y su mensuración</i>	59
Tabla 8. <i>Parámetros cinéticos de crecimiento de Pseudomonas putida calculados en el presente estudio</i>	62
Tabla 9. <i>Características fisicoquímicas iniciales del agua residual efluente de la PTAR Collique</i>	62
Tabla 10. <i>Resultados de los valores promedio y desviación estándar (\pm DS) de la DBO₅ en mg/L al inicio (día 1) y al final (día 5) del experimento</i>	65
Tabla 11. <i>Resultados de los valores promedio y desviación estándar (\pm DS) de la DQO en mg/L al inicio (día 1) y al final (día 5) del experimento</i>	69
Tabla 12. <i>Resultados de los valores promedio y desviación estándar (\pm DS) del pH medido de manera diaria, durante los cinco días que duró el experimento</i>	72
Tabla 13. <i>Resultados de los grados promedio y desviación estándar (\pm DS) de la temperatura (°C), medidos diariamente, durante el experimento</i>	74
Tabla 14. <i>Resultados de los valores promedio y desviación estándar (\pm DS) de la conductividad eléctrica (μS/cm), medidos diariamente, durante el experimento</i>	76

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Valoración de la DBO en base al tiempo transcurrido.....	19
<i>Figura 2.</i> Curva de la DBO ₅ y oxígeno disuelto en un cuerpo de agua receptor.....	21
<i>Figura 3.</i> Representación del árbol filogenético del dominio bacteria, se resalta la división proteobacteria, la cual alberga el mayor número de especies.....	25
<i>Figura 4.</i> Representación esquemática de las paredes celulares: A. Gram positivas y B. Gram negativas.....	26
<i>Figura 5.</i> Apariencia física y agrupamientos bacterianos.....	27
<i>Figura 6.</i> A. 518 cepas de <i>Pseudomonas</i> en Ocho grupos. B. Acercamiento al grupo de las <i>Pseudomonas putida</i> (grupo de color rojo).....	29
<i>Figura 7.</i> Microfotografía de <i>Pseudomonas putida</i> . A: Cepa de <i>P. putida</i> expuesta a un cierto nivel de ampicilina. B: Cepa de <i>P.putida</i> expuesta a altos niveles de antibióticos.....	32
<i>Figura 8.</i> Proceso de formación de <i>biofilm</i>	34
<i>Figura 9.</i> Fotografía de biopelícula formada en espuma de poliuretano, tomada mediante microscopia electrónica de barrido ambiental.....	36
<i>Figura 10.</i> Mapa de ubicación de la PTAR Collique, en la localidad de Collique, distrito de Comas, Lima, Perú	38
<i>Figura 11.</i> Cepa liofilizada de <i>Pseudomonas putida</i> derivada de ATCC 49128 . A: Cepa en empaque KWIK STIK™. B: Ampolla en formato KWIK STIK™	39
<i>Figura 12.</i> Descripción esquemática del procedimiento efectuado en la etapa de campo.	42
<i>Figura 13.</i> Punto de muestreo, penúltima cámara de la infraestructura de tratamiento.....	44
<i>Figura 14.</i> Medición de los parámetros de campo. A: Limpieza del electrodo tras cada medición. B: Medición de la conductividad eléctrica con equipo ANNA modelo HI 9813-6.....	44
<i>Figura 15.</i> Etiquetado de muestras.....	45
<i>Figura 16.</i> Descripción del procedimiento efectuado en la etapa de laboratorio.	46
<i>Figura 17.</i> Flujograma de actividades para la activación de la cepa <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128.....	48

<i>Figura 18.</i> Activación de la cepa <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128. A: Inoculación de la cepa en medio de cultivo sólido. B: Aparición de colonias tras 48 horas de incubación a 30 °C.....	48
<i>Figura 19.</i> A: Medios de cultivo “blanco” y medio inoculado con <i>Pseudomonas putida</i> ATCC. B: Diluciones seriadas a muestra extraída del medio líquido con inóculo bacteriano. C: Placas Petri en incubación a 30 °C.	50
<i>Figura 20.</i> Representación gráfica de los trabajos realizados como parte de los métodos turbidimétrico y de dilución y siembra en placa.....	51
<i>Figura 21.</i> A: Aireación del agua de dilución. B: medición del Oxígeno Disuelto (OD) en los frascos winkler, con equipo HACH modelo HQ40d.....	54
<i>Figura 22.</i> A: Vertido de 2,5 ml de agua muestra en cada vial. B: Viales de DQO con intervalos de 2-80 mg/L (ubicados adelante) y 20-800 mg/L (ubicados atrás), antes del proceso de termorreacción.	55
<i>Figura 23.</i> Acondicionamiento de las unidades experimentales (lavado y esterilización de materiales).....	56
<i>Figura 24.</i> Unidades experimentales dispuestas de manera aleatoria.	57
<i>Figura 25.</i> Disposición aleatoria de las unidades experimentales.	59
<i>Figura 26.</i> Perfil cinético de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128® cuantificado por medio del método de dilución sucesiva y siembra en placa.	61
<i>Figura 27.</i> Contraste entre los resultados de DBO ₅ y DQO de los efluentes de la PTAR Collique (AR) y los valores establecidos en los LMP para efluentes de PTAR (Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM).	63
<i>Figura 28.</i> Contraste entre los resultados de pH y temperatura de los efluentes de la PTAR Collique (AR) y los valores establecidos en los LMP para efluentes de PTAR (Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM).	64
<i>Figura 29.</i> Variación de los valores de DBO ₅ en mg/L al inicio y final del experimento.	65
<i>Figura 30.</i> Reducción porcentual de la DBO ₅ alcanzado por cada tratamiento tras el experimento.....	67
<i>Figura 31.</i> Niveles promedio de la DQO en mg/L, al inicio y final del experimento.....	68
<i>Figura 32.</i> Reducción porcentual de la DQO alcanzado por cada tratamiento tras el experimento.....	70

<i>Figura 33.</i> Niveles promedio de pH en las muestras de cada tratamiento, medidos de manera diaria durante el experimento.	71
<i>Figura 34.</i> Niveles promedio de Temperatura (°C) en cada tratamiento, medidos de manera diaria durante el experimento.	73
<i>Figura 35.</i> Niveles promedio de conductividad eléctrica (μS/cm) en cada tratamiento, medidos diariamente durante el experimento.	75

ÍNDICE DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice 1. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para los resultados de reducción de la DBO ₅	101
Apéndice 2. Análisis de varianza de una vía para los resultados de la DBO ₅	101
Apéndice 3. Prueba de Tukey para los resultados de la DBO ₅	102
Apéndice 4. Análisis de varianza para los resultados de DBO ₅ en porcentaje (%).	102
Apéndice 5. Prueba de Tukey para los resultados de DBO ₅ en porcentaje (%).	102
Apéndice 6. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para los resultados de la DQO.	103
Apéndice 7. Análisis de varianza de una vía para los resultados de la DQO.	103
Apéndice 8. Prueba de Tukey para los resultados de la DQO.	103
Apéndice 9. Análisis de varianza para los resultados de DQO en porcentaje (%).	104
Apéndice 10. Prueba de Tukey para los resultados de DQO en porcentaje (%).	104
Apéndice 11. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para los resultados de pH.	104
Apéndice 12. Análisis de varianza de una vía para los resultados de pH.	105
Apéndice 13. Prueba de Tukey para los resultados de pH.	105
Apéndice 14. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para los resultados de temperatura.	105
Apéndice 15. Análisis de varianza de una vía para los resultados de temperatura.	106
Apéndice 16. Prueba de Tukey para los resultados de temperatura.	106
Apéndice 17. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para los resultados de conductividad eléctrica.	107
Apéndice 18. Análisis de varianza de una vía para los resultados de conductividad eléctrica.	107
Apéndice 19. Prueba de Tukey para los resultados de conductividad eléctrica.	108
Apéndice 20. Análisis de varianza para los parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i>	108

Apéndice 21. Valores de Oxígeno Disuelto (OD) obtenidos en la determinación de la DBO ₅ tras el tratamiento (Día 5).....	108
Apéndice 22. Valores de DQO obtenidos tras el tratamiento, y porcentajes de remoción que representan.....	109
Apéndice 23. Parámetros determinados diariamente durante los 5 días que duró el experimento.	110
Apéndice 24. Resultados de los niveles de absorbancia obtenidos por el crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128; dichas mediciones fueron efectuadas con el Espectrofotómetro UV-Visible cada 60 minutos durante 11 horas continuas.....	111
Apéndice 25. Comparación de pruebas de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC.....	113
Apéndice 26. Registro fotográfico de la investigación.....	113

RESUMEN

En el Perú, la reutilización de las aguas residuales domésticas o su descarga al ambiente de manera segura se ve limitada por la falta de cobertura en el tratamiento o la adopción de tecnologías tradicionales y en muchos casos ineficientes. En ese contexto, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto producido por la cepa bacteriana *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en la reducción de la demanda bioquímica de oxígeno de efluentes extraídos de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de la localidad de Collique, distrito de Comas, provincia de Lima. La investigación implicó el desarrollo de trabajo experimental conforme al Diseño Completamente al Azar (DCA), considerando cuatro tratamientos, incluido el control, con repeticiones triples; de ahí que la única fuente de variación fueron las concentraciones de 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$ y 2×10^8 UFC/ml de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inoculadas en las unidades experimentales por un periodo de cinco días. Los resultados mostraron que el tratamiento uno T1, logró una mayor reducción de la DBO₅ y DQO con valores de $54,79 \pm 1,23$ y $51,62 \pm 1,41$ % respectivamente; por su parte, los valores de pH fluctuaron entre $6,60 \pm 0,10$ y $8,23 \pm 0,05$ encontrándose dentro del rango óptimo para los procesos de biorremediación; mientras que la temperatura se mantuvo entre $25,36 \pm 0,11$ y $27,47 \pm 0,12$ °C sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0,149 > \alpha = 0,05$). Por lo que, dadas las condiciones de laboratorio descritas en el presente estudio, se concluye que el efecto producido por *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en la reducción de la DBO₅ de efluentes de PTAR, fue significativo.

Palabras clave: DBO₅, DQO, *Pseudomonas putida* ATCC 49128, cepa bacteriana, biorremediación.

ABSTRACT

In Peru, the reuse of domestic wastewater or its safe discharge to the environment is limited by the lack of coverage in treatment or the adoption of traditional and in many cases inefficient technologies. Based on that, the present research aimed to evaluate the effect produced by the bacterial strain *Pseudomonas putida* ATCC 49128 in reducing the biochemical oxygen demand of effluents extracted from the Wastewater Treatment Plant (WWTP) of the town of Collique, district of Comas, province of Lima. The research involved the development of experimental work according to the Completely Random Design (DCA), considering four treatments, including the control, with triple repetitions; hence the only source of variation were the concentrations of 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$ and 2×10^8 CFU/ml of *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inoculated in the experimental units for a period of five days. The results showed that treatment one T1, achieved a greater reduction in BOD₅ and COD with values of $54,79 \pm 1,23$ and $51,62 \pm 1,41$ % respectively; meanwhile, the pH values fluctuated between $6,60 \pm 0,10$ and $8,23 \pm 0,05$, being within the optimal range for bioremediation processes; while the temperature remained between $25,36 \pm 0,11$ and $27,47 \pm 0,12$ ° C without showing significant differences between the treatments ($p = 0,149 > \alpha = 0,05$). Therefore, given the laboratory conditions described in the present study, it is concluded that the effect produced by *Pseudomonas putida* ATCC 49128 in reducing the BOD₅ of WWTP effluents, was significant.

Key words: BOD₅, COD, *Pseudomonas putida* ATCC 49128, bacterial strain, bioremediation.

INTRODUCCIÓN

La perspectiva actual de crecimiento económico, social y cuidado ambiental a la vez, supone un reto sin precedentes para la humanidad. En el ámbito ambiental, el desarrollo e implementación de tecnologías de bajos costos, eficientes y sobre todo amigables al ambiente son más que necesarias. En ese sentido, la biorremediación se perfila como una alternativa con las características y el potencial necesario para hacer frente a los impactos ambientales negativos de carácter antropogénico; dentro de los cuales se encuentra la degradación ambiental generado por las aguas residuales domésticas o municipales (Garzón *et al.*, 2017).

La Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento (SUNASS, 2016) señala que, en el Perú, la problemática generada en torno a las aguas residuales recae principalmente en dos aspectos; el primero tiene que ver con la falta de cobertura en el tratamiento y el segundo, implica la adopción de tecnologías de tratamientos tradicionales y en muchos casos ineficientes. En consecuencia, la falta de atención a estos aspectos dificulta el cumplimiento de los parámetros exigidos en la normativa ambiental vigente, entre ellos la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅), y merma la posibilidad de reutilizar las aguas residuales tratadas o descargarlas al ambiente de manera segura.

Los contaminantes orgánicos contenidos en las aguas servidas, demandan oxígeno para ser degradados biológicamente. Teniendo en cuenta que las aguas residuales domésticas albergan altos porcentajes de materia orgánica, que por lo general no es eliminada en su totalidad durante el tratamiento; resulta pertinente y necesario desarrollar formas de tratamientos adicionales como la biorremediación, que permitan reducir la cantidad de materia orgánica y por ende la DBO₅ de las aguas residuales efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR). Ello contribuiría, entre otros aspectos, a que se propicie la disponibilidad de oxígeno que requieren la flora y fauna de los cuerpos receptores para su normal desarrollo (Raffo y Ruiz, 2014).

En ese sentido, existen diversas investigaciones desarrolladas en el territorio nacional, las cuales utilizan a las bacterias del género *Pseudomonas* para remover metales pesados o reducir los niveles de compuestos nitrogenados, fósforo y materia orgánica del agua (Anaya, 2019; Mena y Rafael, 2016 y Takahashi, 2018). Más aún, en el ámbito internacional también se describen estudios similares en el campo de la bioremediación; ello demuestra la relevancia en cuanto a la utilización de esta tecnología, y corrobora el potencial de esta cepa bacteriana para ser utilizada como agente depurador de las aguas residuales (Bedoya *et al.*, 2019; Flórez 2016 y Pellizzari *et al.*, 2015).

Por su parte, Chitiva y Dussán (2003) resaltan la pertinencia que tiene el inmovilizar las células bacterianas de *Pseudomonas putida* durante los procesos de depuración de las aguas residuales; indicando que ello favorece al desarrollo de una alta concentración bacteriana que permite una mejor depuración de las aguas residuales a tratar; además, la inmovilización celular propicia la formación de *biofilm* con lo cual los microorganismos adquieren una mayor tolerancia a compuestos tóxicos y a cambios bruscos de temperatura y pH. No obstante, a pesar de las bondades que otorgan los medios de soporte durante la remoción de contaminantes, los autores subrayan que el tipo de soporte y sus características surten un importante rol, tanto en la adaptación y desarrollo de las poblaciones microbianas, como en la velocidad y eficacia a la hora de reducir las cargas contaminantes.

Finalmente, teniendo en cuenta que la liberación de aguas residuales de baja calidad o sin tratamiento alguno supone un peligro ambiental y social latente, surge la necesidad de atender esta problemática en aras de contribuir al desarrollo sostenible del país. Por lo que, el presente trabajo académico pretende dar una alternativa biotecnológica, evaluando el efecto de las bacterias *Pseudomonas putida* ATCC 49128, para reducir la demanda bioquímica de oxígeno de los efluentes de la PTAR Collique, lo cual supone información valiosa respecto al conocimiento de este microorganismo como depurador de las aguas residuales domésticas en el Perú.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en la reducción de la demanda bioquímica de oxígeno de efluentes extraídos de la PTAR Collique.

Objetivos específicos

- Estudiar la cinética de crecimiento de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en condiciones de laboratorio.
- Comparar las características fisicoquímicas que presenta el agua residual efluente de la PTAR Collique, con los límites máximos permisibles para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales.
- Determinar la variación de la demanda bioquímica de oxígeno de los efluentes de la PTAR Collique por efecto de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizadas en espumas de poliuretano.
- Evaluar el efecto sobre los parámetros DQO, pH, conductividad eléctrica y temperatura de los efluentes de la PTAR Collique, por influencia de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizadas en espumas de poliuretano.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Internacional

Flórez (2016) desarrolló un estudio de alcance descriptivo en el cual avaluó la capacidad de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina* y *Hafnia alvei* para reducir la DBO₅ y otros parámetros como la DQO y los sólidos totales suspendidos de residuos líquidos en una industria dedicada a la producción de lácteos en Manizales, Colombia. Como parte del diseño de la investigación, el autor caracterizó las muestras de efluentes lácteos y aisló los microorganismos en Caldo Nutritivo. Posteriormente, dispuso cinco tratamientos con tres repeticiones cada uno, los cuales contenían 300 ml de efluente lácteo a tratar; tres de los tratamientos fueron inoculados con cada una de las bacterias en mención, mientras que un cuarto tratamiento consistió en la mezcla de las tres cepas bacterianas y en un quinto tratamiento no se inoculó ningún microorganismo. Todas las muestras fueron aireadas mediante burbujeo durante 48 horas a temperatura ambiente, para dicha tarea utilizaron recipientes beaker con capacidad de 600 ml. Los resultados indicaron que, *Pseudomonas putida* obtuvo los valores más altos en cuanto a la remoción de los contaminantes; la DBO₅ fue reducida en un 87,45 %, la DQO en 65,55 % y los SST en un 57,37 %. No obstante, la investigación concluyó que, pese a los altos niveles de remoción provocados por dichos microorganismos, los efluentes no alcanzaron la calidad exigida por la legislación medioambiental, posiblemente por las altas cargas de contaminantes orgánicos que poseían este tipo de aguas.

Botello *et al.* (2016) llevaron a cabo una investigación en la cual evaluaron distintos polímeros sintéticos como soportes de inmovilización microbiana, estableciendo su desempeño mediante

la reducción de la carga orgánica de un agua residual sintética en Yopal, Colombia. El procedimiento consistió en la selección y recorte de materiales sintéticos tales como; espumas de poliuretano (EPU), caucho sintético (BD) y poliestireno expandido (EPS) en tamaños de 1 cm³, además del recorte de tereftalato de polietileno (PET) y polietileno (P) en tamaños de 0,2 cm³, los cuales fueron esterilizados. Los investigadores determinaron el tamaño poblacional de los microorganismos en número de unidades formadoras de colonias por cada gramo de soporte (UFC/g); a la vez, evaluaron el desempeño de cada soporte sintético en función del grado de remoción porcentual de materia orgánica alcanzado. Los resultados, analizados al 99 % de representatividad mediante análisis las varianzas y la prueba de Tukey, mostraron que la espuma de poliuretano y el caucho sintético fueron los soportes que permitieron una mayor proliferación de células bacterianas con valores de 4,6 x 10⁷ UFC/g y 2,2 x 10⁷ UFC/g respectivamente; además, el soporte de espumas de poliuretano mostró un mejor desempeño debido a que propició la reducción del 94,4 % de la DBO₅ y el 93,6 % de la DQO en los efluentes del agua residual sintética.

En el trabajo abordado por Azoddein *et al.* (2015) estudiaron, a la cepa *Pseudomonas putida* y el efecto que esta provocó en la degradación de compuestos orgánicos y sólidos en suspensión de efluentes producidos durante el molido de palma aceitera en Pahang, Malasia. El estudio contempló el uso de un biorreactor, el cual fue alimentado con caldo de mezcla a base de células de *Pseudomonas putida* y agua residual previamente caracterizada, en proporciones de 1:9 respectivamente; además, mantuvieron una temperatura constante de 37 °C en el biorreactor e inyectaron oxígeno a flujos de 0,5; 1,0 y 1,5 L/min durante las 24 horas que duró el experimento. Los resultados mostraron influencia de *Pseudomonas putida* en la descontaminación de las muestras de agua; es así que, los resultados más sobresalientes fueron obtenidos a una velocidad de aireación de 1,0 L/min, con valores del 99,03 % (DBO), 46,73 % (DQO) y 71,88 % de reducción de sólidos totales en suspensión; mientras que los valores de remoción porcentual más bajos fueron de 70,67 % y 31,82 % para la DBO₅ y DQO respectivamente, y a un nivel de aireación de 0,5 L/min. El estudio concluyó que, el método biotecnológico adoptado, poseen el potencial necesario para alcanzar una depuración efectiva en efluentes industriales de este tipo.

Tirado *et al.* (2014), compararon la capacidad de tres cepas de *Pseudomonas* para reducir la demanda bioquímica de oxígeno de los cinco días (DBO₅) de aguas procedentes de una ciénaga, en Cartagena, Colombia. Los autores, como parte del diseño metodológico extrajeron tres muestras compuestas de distintos puntos de la ciénaga (Z1, Z2 y Z3), e identificaron su contenido bacteriano con el kit BBL Crystal Identification System – BD, previo aislamiento en medio Cetrimide. Posteriormente, a 200 ml de muestra extraída de cada uno de los puntos de la ciénaga, fueron agregadas concentraciones de 0,5 turbidez de Mc Farland de cada género bacteriano identificado; además, los investigadores consideraron la evaluación de muestras blanco (agua destilada) y muestras testigo (combinación de las tres muestras compuestas). Cada una de las muestras fueron evaluadas según el grado de remoción de materia orgánica alcanzado, determinado mediante el parámetro de la DBO₅. Los resultados, procesados estadísticamente en el programa Prisma y mediante las pruebas “t” de Student y Komoronov Smirnov al 5 % de significancia, aluden a que los géneros bacterianos aislados fueron: *Pseudomonas alcaligenes*, *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa*; de las cuales en los puntos Z1 y Z3, *Pseudomonas aeruginosa* logró una reducción máxima de la DBO₅ con valores de 86,8 y 87,8 % respectivamente, mientras que *Pseudomonas alcaligenes* alcanzó una remoción del 86,35 % de la DBO₅; entre tanto, *Burkholderia cepacia* logró una disminución del 98,9 % de la DBO₅. Finalmente, los autores concluyeron que los valores porcentuales de DBO₅ reducidos por cada una de las cepas bacterianas, son estadísticamente iguales, por lo que cualquiera de estas podría ser utilizadas con fines biotecnológicos.

Mansour *et al.* (2011) examinaron el comportamiento de *Pseudomonas putida* durante el tratamiento de efluentes líquidos generados en la producción de aceite de oliva en Monastir, Túnez y evaluaron, desde un enfoque cuantitativo, el potencial biorremediador de dichas bacterias. La metodología adoptada implicó, por un lado, la caracterización de los efluentes muestra, tras la cual realizaron el cultivo de células de *Pseudomonas putida* en un medio de crecimiento compuesto por levadura, peptona, glucosa y agua muestra en concentraciones de 10, 3, 5 y 5 g/L respectivamente, contenidos en matraces de 250 ml e incubados durante 48 horas a 30 °C con agitación giratoria de 200 rpm. Posteriormente, centrifugaron 1700 g del medio de cultivo durante diez minutos, para recolectar las células cultivadas y transferirlas a

matraces de 250 ml, los cuales albergaron muestras de agua al 33 % (v/v en agua esterilizada). Por otro lado, para determinar la reducción del grado de toxicidad del agua, utilizaron ratas blancas de igual edad y peso, a las cuales les suministraron dosis únicas de agua con y sin tratamiento. Finalmente, pasadas las 48 horas que duró el experimento, con inyección de aire y agitación constante (200 rpm), realizaron la determinación de la decoloración, el contenido fenólico, la DQO y la DBO₅ en muestras con y sin microorganismos de *Pseudomonas putida*, al mismo tiempo sacrificaron a las ratas para identificar anomalías en los cromosomas celulares, riñones, hígado, etc. Los resultados, analizados según la prueba de Duncan en el programa *Statistica* edición 99, a un $p < 0,05$; indicaron que los efluentes en estudio, con la dilución realizada, no limitó el crecimiento de *Pseudomonas putida*, mismas que lograron reducir la coloración y el contenido fenólico del agua en un 75 y 66 % respectivamente, y alcanzaron una disminución del 85,3 % de la DQO y el 92,5 % de la DBO₅; por otro lado, a pesar de evidenciar la reducción del contenido de fenoles, ninguna de las dosis administradas mostraron un efecto tóxico para las ratas. Además, el estudio concluyó que la cepa bacteriana *Pseudomonas putida*, presentó una alta eficiencia en la remoción de contaminantes aromáticos presentes en este tipo de aguas residuales.

Wang *et al.* (2008) desarrollaron un estudio de alcance descriptivo, para determinar la remoción de contaminantes orgánicos del agua utilizando microorganismos inmovilizados, aislados de dos lagos en Wuhan, China. Como parte de la metodología, los autores inocularon muestras de agua diluidas en placas de agar y las aclimataron durante ocho semanas con agregados de nitrato de amonio, hidrógeno dipotásico y glucosa. Por otro lado, realizaron la inmovilización microbiana en un portador *diatomita* introducida por 30 minutos en un medio con microorganismos aclimatados en suspensión a una temperatura de 30 °C; tras ello, los microorganismos inmovilizados fueron añadidos a 50 ml de muestra, para evaluar su nivel de remoción de nitrógeno, fósforo y contaminantes orgánicos. Los resultados, de la correlación bacteriana fueron analizados mediante el ANOVA y mostraron que los aislados bacterianos más abundantes pertenecieron al género *Pseudomonas*; así mismo, la remoción de la materia orgánica, fósforo y nitrógeno alcanzados fue de 80,2; 81,6 y 86,8 % respectivamente a las 24 horas de exposición, a una concentración de microorganismos inmovilizados de 0,75-1 g/50 ml

y a un pH fluctuante entre 7 y 8. Finalmente, los autores concluyeron que las cepas bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas* presentan una alta capacidad adaptativa y facilidad para eliminar nitrógeno, fósforo y contaminantes orgánicos presentes en las muestras de agua.

Chitiva y Dussán (2003) evaluaron cuantitativamente tres matrices como fuentes de inmovilización de *Pseudomonas* spp. y la velocidad con la que estos microorganismos inmovilizados removían el fenol, en Bogotá, Colombia. Como parte de la metodología los autores utilizaron tres matrices de inmovilización, las cuales fueron: cubos de poliuretano de 5 mm de lado (7 g), una matriz a base de perlas de alginato de sodio y una mezcla de alginato de sodio y alcohol polivinílico en concentraciones porcentuales de 2 y 6 respectivamente; también incluyeron, como parte del trabajo experimental, un medio sin matriz en el cual las células bacterianas estuvieron libres. Todos los tratamientos recibieron 100 ml de un medio con contenido de sales al mínimo (MMS), el cual albergó 10 UFC/ml de *Pseudomonas* spp y 200 ppm de fenol. Finalmente, para determinar la capacidad de inmovilización bacteriana en las matrices, mediante recuento en agar nutritivo, y la eficiencia de remoción del fenol, por medio del método de la *American Society for Testing and Materials* 1996; fueron acondicionados medios controles con las mismas características de las unidades descritas, pero con ausencia de microorganismos para efectos de comparación. Los resultados, indicaron que el tratamiento con matriz de espuma de poliuretano alcanzó una concentración bacteriana de 4×10^8 UFC/ml y una reducción del fenol de hasta 80 ppm (60 %) a los siete días de exposición, siendo la matriz que propició el mejor crecimiento bacteriano y la degradación del contaminante con alta eficiencia en comparación a los demás tratamientos, incluyendo el tratamiento sin matriz. Finalmente, los autores concluyeron que la inmovilización bacteriana, sea por atrapamiento o adsorción, supone un factor clave para lograr una biorremediación de los contaminantes del agua, con alta eficiencia.

Nacional

Anaya (2019) desarrolló una investigación con el objetivo de evaluar la capacidad de *Pseudomonas putida* para remover nitrógeno (N) y fósforo total (P) en aguas procedentes de un humedal costero en Lima, Perú. La metodología del estudio abordó dos etapas bien definidas, una de campo y otra de laboratorio; esta última implicó el desarrollo de ensayos experimentales, los cuales estuvieron constituidos por cuatro biofiltros que albergaron un litro de muestra sometida a diferentes concentraciones de *Pseudomonas putida* aisladas en esferas de alginato de calcio. Tras ello, el investigador realizó un análisis de las muestras cada doce horas durante tres días, lo cual le permitió determinar el contenido de N y P en las muestras, y monitorear otros parámetros de interés como el pH y la conductividad eléctrica. Los resultados, analizados mediante el ANOVA de una vía a un nivel de significancia del 5 % mostraron que, a las 72 horas de exposición, el tratamiento tres, constituido por 0,06 kg de alginato de calcio en forma de pequeñas esferas que alojaban a las células de *Pseudomonas putida*, obtuvo una mayor efectividad en la reducción porcentual de N y P con valores de 88,7 % y 49,2 % respectivamente. En consecuencia, el estudio concluyó que, en condiciones de laboratorio, la cepa bacteriana *Pseudomonas putida* tiene la capacidad para remover N y P de este tipo de muestras de agua y que los valores de pH se mantuvieron relativamente constantes entre 7,7 y 8.

En lo que respecta a las características fisicoquímicas de las aguas residuales tratadas, Montenegro (2016) desarrolló una investigación, en la cual determinó diversos parámetros en aguas residuales efluentes, como parte de un estudio que tuvo como objetivo evaluar la eficiencia de una PTAR de la localidad El Parco en Amazonas, Perú. La metodología adoptada abarcó la toma de muestras, constituidas por afluentes y efluentes de la infraestructura de tratamiento; las cuales fueron colectadas cada siete días, durante doce semanas; a la vez, para determinar los parámetros de campo como pH, temperatura y conductividad eléctrica; el autor siguió el protocolo de monitoreo aprobado por el Ministerio de Vivienda Construcción y Saneamiento (2013) mediante la resolución N° 273; mientras que los parámetros de laboratorio, tales como DBO₅, DQO y SST fueron determinados según los Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. Los resultados procesados en el programa Microsoft

Excel 2013, indicaron que los efluentes presentaron valores promedio de temperatura de 26,4 °C; pH 7,4; DBO₅ 117,5 mg/L, DQO 210 mg/L y 22,5 mg/L de SST, respectivamente. En cuanto a la reducción porcentual de los parámetros, la PTAR redujo la DBO₅ en un 92,1 %; además del 92,3 % de DQO y logró una remoción del 49,4 % de sólidos totales en suspensión. No obstante, a pesar de los altos porcentajes de remoción alcanzados por la infraestructura de tratamiento, la investigación concluyó que se debieron reducir aún más los valores de la DBO₅ y DQO, puesto que fueron superiores a los niveles límite de contaminación permitidos por la normativa ambiental peruana.

Morillo y Guevara (2014) determinaron, cuantitativamente, el efecto producido por distintos niveles de pH, y por la exposición a diferentes grados de temperatura durante un proceso de biorremediación de cianuro de sodio (NaCN), utilizando la cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. como agente depurador, misma que fue aislada de lodos activados extraídos de la PTAR Covicorti en Trujillo, Perú. La metodología implicó la conformación de bioensayos, compuestos por seis matraces Erlenmeyer con inóculos de *Pseudomonas* sp., en razón de $1,3 \times 10^9$ cel/ml disueltos en 0,1 L de solución tampón carbonato y una concentración determinada de NaCN. Las mediciones de la concentración residual de cianuro la realizaron por medio del método titulométrico, cada 24 horas durante seis días. Los resultados, procesados en el programa estadístico SPSS v.20 y sometidos al ANOVA y prueba de Tukey, mostraron que *Pseudomonas* sp., alcanzó una máxima degradación de NaCN a un nivel de pH de 9,5 con valores de 648 y 655 ppm a 32 y 36 °C respectivamente; mientras que la mínima degradación de NaCN fue obtenida a un nivel pH más alto (10,5) con valores de 312 y 203 ppm también a temperaturas de 32 y 36 °C. Los investigadores concluyeron que el factor pH fue el más relevante en los procesos de biodegradación llevados a cabo por *Pseudomonas* sp., puesto que, a un mismo nivel de pH, las diferencias estadísticas observadas no presentaron significancia a pesar de ser sometidos a distintos grados de temperatura.

1.2. Bases teóricas especializadas

1.2.1. Aguas residuales

Todas las actividades humanas generan residuos, gran cantidad de los cuales son residuos líquidos a los que denominamos aguas residuales; más aún, en un contexto amplio podemos identificar una enorme variedad de situaciones en las cuales el hombre hace uso del recurso hídrico para cubrir sus necesidades; por lo que, inexorablemente, el agua utilizada adopta características distintas a las que poseía inicialmente; en consecuencia y dadas sus características altamente contaminantes, es necesario que dichas aguas reciban tratamiento antes de ser vertidas al ambiente o ser reutilizadas (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2012).

Por su parte, Raffo y Ruiz (2014) señalan que “la contaminación de las aguas es inevitable, ya sea por las condiciones o fenómenos propios de la naturaleza o por la intervención humana” (p. 74). No obstante, la contaminación antropogénica resulta más perjudicial debido a la abrumadora cantidad y diversidad de contaminantes que aporta a las fuentes de agua. Tal contaminación es atribuible al desarrollo de actividades agrícolas, industriales, energéticas y sobre todo domésticas (pues aportan la mayor cantidad de aguas residuales), que alteran uno o más parámetros del agua al introducir contaminantes de tipo físico, biológico o químico; además, muchas de estas aguas albergan componentes tóxicos como los metales pesados, susceptibles a acumularse en los tejidos animales y vegetales consumibles por el ser humano, provocando enfermedades o en el peor de los casos la muerte.

a. Tipología de las aguas residuales según su origen

Respecto a la tipología de las aguas residuales, Romero (2010) propone una diferenciación de estas teniendo en cuenta, como factor primordial, su origen. Debido a lo cual, podemos diferenciar aguas residuales de tres tipos, como se muestra a continuación.

- **Aguas residuales de origen doméstico.** Son aguas originadas por actividades fisiológicas, generalmente en viviendas o espacios en los cuales se usa el agua para cubrir necesidades de aseo, alimentación, recreación, etc. Además, dentro de las aguas residuales domésticas, es posible diferenciar a las aguas grises, proveniente de las duchas y lavaderos y las aguas negras, provenientes de los inodoros las cuales albergan entre otros, materia fecal, virus y orina.
- **Aguas residuales de origen industrial.** Corresponden a aquellos residuos líquidos generados por el aparato industrial de distinto giro y ámbito, las cuales por lo general albergan componentes químicos, entre ellos metales pesados.
- **Aguas residuales de origen municipal.** Estas últimas podrían incluir aguas aluviales y la mezcla de aguas domésticas y aguas industriales; en un contexto ideal, estas últimas deberían cumplir con los Valores Máximos Admisibles (VMA) antes de su descarga en el sistema de drenaje público.

Las aguas residuales de origen doméstico son las más abundantes, y son las que albergan los mayores porcentajes de materia orgánica, cerca del 75 % de sólidos de su composición. Sin embargo, las redes de drenaje y alcantarillado municipales, albergan también diversos compuestos químicos, aceites, detergentes, metales, etc., los cuales varían en cantidad y tipo según el aporte de las fuentes domésticas y no domésticas, muchas de las cuales introducen cargas contaminantes elevadas que superan los valores máximos admisibles, es decir, que sobrepasan los valores de contaminación permitidos para el vertimiento a las alcantarillas; ello conlleva a que las infraestructuras de tratamiento realicen un mayor esfuerzo para lograr una adecuada depuración de los residuos líquidos (Metcalf y Eddy, 1995).

b. Las aguas residuales domésticas y sus características

Cada agua residual doméstica tiene características y composición propia de acuerdo a la población que lo genera, por lo que el conocimiento de su naturaleza estaría supeditado a una caracterización individualizada del agua residual de interés. No obstante, Romero (2010) en

concordancia con Metcalf y Eddy (1995) indican que hay ciertas características típicas como referencia de las aguas residuales domésticas; ello facilita el entendimiento sobre los parámetros a analizar y la magnitud con la que estos podrían manifestarse. Además, los autores subrayan que conocer los componentes que caracterizan a un determinado residuo líquido supone el punto de partida hacia la óptima depuración de los mismos, ya que permiten distinguir su naturaleza y optar por formas adecuadas de tratamiento. En ese sentido, en la Tabla 1 se revisan algunas de las características más resaltantes que presentan las aguas residuales domésticas, desde el punto físico, químico y biológico.

Tabla 1

Principales características de las aguas residuales domésticas

Característica	Descripción
Físicas	<p><i>Olor</i>, su intensidad varía según el grado de sulfatos y carga orgánica albergada, mismos que al reducirse generan gases, los cuales son percibidos como olores desagradables.</p> <p><i>Color</i>, desde tonalidades de gris a negro, según el nivel de descomposición de las sustancias contenidas y el tiempo transcurrido desde la generación del agua residual.</p> <p><i>Temperatura</i>, es influenciada por el vertimiento de aguas con altas temperaturas, ello propicia un incremento en las reacciones químicas y disminuye la solubilidad del oxígeno.</p>
Químicas	<p><i>Alcalinidad</i>, varía entre 50 a 200 mg CaCO₃/L, lo cual indica que las aguas tienen cierta capacidad <i>buffer</i> para amortiguar los ácidos.</p> <p><i>Carbohidratos</i>, son muy comunes en este tipo de aguas e involucran a los azúcares, fibras de madera, almidón y celulosa; esta última posee el menor grado de solubilidad.</p> <p><i>Proteínas</i>, son constituidas por aminoácidos, los cuales aportan considerables cantidades de nitrógeno al agua. Además, su descomposición contribuye a la generación de olores.</p> <p><i>Nitrógeno y Fósforo</i>, generalmente en concentraciones circundantes a 40 y 8 mg/L respectivamente; suponen importantes fuentes de alimento para microorganismos y algas.</p>
Biológicas	<p><i>Bacterias</i>, elemento clave en la purificación de las aguas servidas; reducen la carga carbonacea y demás contaminantes. Su óptimo desarrollo depende de parámetros ambientales como el pH.</p> <p><i>Virus</i>, abundan en los residuos líquidos de tipo domésticos, puesto que se hospedan, en cantidades atingentes, en los seres humanos. Además, son capaces de resistir hasta 72 horas en un cuerpo de agua natural.</p>

Principales características de las aguas residuales domésticas (continuación)

Algas, establecen una relación simbiótica con las bacterias, proporcionándolas oxígeno y recibiendo a cambio CO₂ como fuente de carbono. No obstante, su rápida proliferación podría ocasionar alteraciones en los niveles de pH y generación de olores desagradables. *Hongos*, en su mayoría saprofitos, contribuyen en los procesos de descomposición de la materia orgánica, regulan el ciclo del carbono y mantienen una relación simbiótica con las bacterias.

Fuente: Elaboración propia, a partir de (Metcalf y Eddy, 1995; Romero, 2010).

1.2.2. Contaminación ambiental por aguas residuales domésticas

El desequilibrio ecosistémico provocado por las aguas residuales es muy perceptible en cuerpos de agua lénticos y lóticos receptores. Es así que, las alteraciones que provocan las aguas residuales domésticas en cursos de agua naturales como los ríos y quebradas, se encuentran relacionadas al incremento de la carga microbiana o la disminución de oxígeno en el medio; esta última solo se restablece parcialmente a 38 km y totalmente a 135 km aguas abajo o 7 días de recorrido (Ramalho, 2003, p.22). En ese sentido, Orozco (2005) sostiene que los ambientes acuáticos poseen mecanismos de autopurificación y dilución como principales herramientas para hacer frente a la contaminación. Lo cual implica que la incidencia negativa generada por los residuos líquidos domésticos sobre los medios acuáticos naturales, solo es posible cuando las cargas contaminantes de los efluentes son elevadas, rebasando las capacidades de autodepuración que poseen los medios acuáticos naturales, o cuando los volúmenes de agua de los cuerpos receptores son muy pequeños para diluirlos. Teniendo en cuenta estos aspectos, la Tabla 2 expone las concentraciones típicas de elementos perjudiciales que las aguas residuales aportarían al ambiente, en caso estas no sean tratadas.

Además, cabe mencionar que las aguas residuales de origen doméstico presentan considerables cantidades de elementos carbonáceos que demandan oxígeno para ser degradados de forma biológica; al ocurrir estos procesos de degradación, hay un agotamiento del oxígeno disuelto requerido por la biota acuática del medio, lo cual propicia la variación de parámetros como el pH. En consecuencia, debido a la alteración de los parámetros en los cuerpos de agua naturales

y al agotamiento de oxígeno a concentraciones menores a 4 g/m³ se produce la muerte de peces, y la aparición de microorganismos anaerobios, con lo cual los cuerpos de agua receptores tienden a convertirse en entornos anóxicos e inhabitables para muchos organismos superiores autóctonos (Orozco, 2005).

Tabla 2

Concentraciones típicas de contaminantes aportados por aguas residuales domésticas

Contaminante	Concentración débil	Concentración media	Concentración fuerte	Unidades
Sólidos totales	350	720	1200	mg/L
Sólidos disueltos	250	500	850	mg/L
Sólidos suspendidos	100	220	350	mg/L
Sólidos suspendidos fijos	20	55	75	mg/L
Sólidos suspendidos sedimentables	5	10	20	ml/L
DBO ₅	110	220	400	mg/L
DQO	250	500	1000	mg/L
Nitrógeno total	20	40	85	mg/L
Nitrógeno orgánico	8	15	35	mg/L
Nitrógeno amoniacal	12	25	50	mg/L
Fósforo total	4	8	15	mg/L
Fósforo orgánico	1	3	5	mg/L
Cloruros	30	50	100	mg/L
Grasas	50	100	150	mg/L
<i>Escherichia.coli</i>	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁷ -10 ⁸	10 ⁸ -10 ⁹	NMP/100ml

Fuente: Elaboración propia, a partir de (Orozco, 2005; Romero, 2010).

1.2.3. Depuración de las aguas residuales de origen doméstico

Depurar y reusar las aguas residuales de naturaleza doméstica constituye una actividad promovida por el gobierno como parte de las políticas públicas en materia de medio ambiente; ello a fin de garantizar una calidad de vida digna para los individuos y la prevalencia de ecosistemas funcionales y perdurables en el tiempo. En tal sentido, en el año 2010 el Ministerio del Ambiente promulgó los límites máximos permisibles (LMP) para los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas o municipales (PTAR) para el sector vivienda, por Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM. Dicha norma establece los niveles máximos de cargas contaminantes que pueden albergar los efluentes de PTAR antes de su liberación al ambiente o sobre componentes acuáticos receptores, y que de superarse podrían causar daños a la salud

humana y contribuir en la ruptura del equilibrio ecológico; finalmente, la calidad de este tipo de efluentes es determinada en base a siete parámetros, los cuales se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Límites máximos permisibles (LMP) para efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales (PTAR)

Parámetro	LMP de efluentes para vertidos a cuerpos de agua	Unidad
Aceites y grasas	20	mg/L
Coliformes Termotolerantes	10 000	NMP/100 ml
Demanda Bioquímica de Oxígeno	100	mg/L
Demanda Química de Oxígeno	200	mg/L
pH	6,5 – 8,5	Unidad
Sólidos Totales en Suspensión	150	ml/L
Temperatura	<35	°C

Fuente: (Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM).

a. Infraestructuras y procesos de purificación de las aguas residuales

Las infraestructuras de purificación de aguas residuales denominadas PTAR, están constituidas por sistemas secuenciales en las cuales se llevan a cabo procesos físicos, biológicos y químicos que permiten depurar las aguas residuales, sean estas de tipo doméstico, industrial o municipal (Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM). Por otro lado, Akpor y Muchie (2011) sostienen que la implementación de infraestructuras de tratamiento de residuos líquidos y por ende la depuración de estas aguas, es una actividad necesaria y de gran importancia por dos razones principales; una de ellas es porque previene la degradación de los recursos hídricos y el ambiente; y la otra, porque supone una garantía para la salud individual y colectiva de las personas.

En países de Latinoamérica se tiende a tratar las aguas residuales por etapas; las cuales, como expone la Tabla 4, por lo general son: etapa de tratamiento preliminar, primario, secundario y etapa de tratamiento terciario o avanzado; además de las etapas adicionales de desinfección y disposición de lodos. Sin embargo, la selección del proceso de tratamiento dependerá de las

características del cuerpo receptor, de la tipología del efluente líquido a tratar o del uso al que se destinará el agua tratada (Rojas, 2002 y Ministerio de Vivienda Construcción y Saneamiento [VIVIENDA], 2006). En este contexto, Metcalf y Eddy (1995), afirman que las etapas de purificación de aguas residuales implican operaciones y procesos unitarios, los cuales se diferencian entre sí por la predominancia de fenómenos físicos en las operaciones, y fenómenos biológicos y químicos en los procesos. En las infraestructuras de tratamientos convencionales, las operaciones y procesos unitarios son claramente distinguibles; es así que, tal como se indica en la Tabla 4, en las etapas de tratamiento preliminar y en parte de los tratamientos primarios los fenómenos más importantes son de tipo físico, dado que se llevan a cabo con el objetivo de retener y sedimentar la mayor cantidad de sólidos; por el contrario en las etapas de tratamiento secundario y terciario los fenómenos más relevantes son de carácter químico y biológico, por la intervención de microorganismos como las bacterias, algas e incluso hongos.

Tabla 4

Etapas de purificación de las aguas residuales, objetivos e infraestructuras tradicionales aplicables

Etapa	Objetivo	Infraestructura aplicable
Tratamiento preliminar	Retener los sólidos gruesos y material abrasivo del agua, para evitar daños a las infraestructuras de las etapas de tratamiento posteriores.	Trampas de grasa, cribas, desarenadores, medidores, repartidores de caudal, etc.
Tratamiento primario	Remover en parte la materia sedimentable.	Tanques Imhoff, reactores UASB, sedimentadores, etc.
Tratamiento secundario	Remover los elementos biodegradables y materia suspendida que aún se encuentra en el agua.	Lagunas de estabilización, filtros biológicos, lodos activados, etc.
Tratamiento terciario	Eliminar los microorganismos patógenos, remover los sólidos no sedimentables y nutrientes, etc.	Lagunas de maduración, ósmosis inversa, etc.
Desinfección	Eliminar virus, bacterias y demás agentes patógenos.	Instalaciones de cloración

Manejo de lodos	Estabilizar los lodos, mediante deshidratación y la reducción de las componentes volátil con características orgánicas.	Lechos de secado, lagunas de secado, etc.
------------------------	---	---

Fuente: Elaboración propia, a partir de (Rojas, 2002; VIVIENDA, 2006).

1.2.4. Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)

Según Angel (1994), la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) es un factor trascendental y uno de los parámetros por excelencia, empleados para determinar la contaminación biológica existente en las aguas residuales. Este parámetro fue difundido por la *British Comission of Sewage Dispos*al y se empezó a determinar bajo ciertas pautas tales como; mantener un tiempo de incubación de cinco días a una temperatura constante de 20 °C, debido al recorrido de los ríos y temperatura media del verano en Inglaterra. No obstante, con el paso del tiempo dichos criterios se estandarizaron y actualmente se aplican en ensayos llevados a cabo en diversas partes del mundo, pese a que las situaciones de recorrido y temperatura media de los cuerpos de agua sean diferentes a los de Inglaterra.

Al respecto, Aznar (2000) hace énfasis en algunos aspectos que deben tomarse en cuenta para la correcta determinación y análisis de la DBO, los cuales son: realizar diluciones de las muestras de agua hasta 3 mg/L de DBO, dado que en muchas de las situaciones el oxígeno consumido por la biota acuática es mayor al existente en el medio; constatar la existencia de microorganismos degradadores de la materia orgánica o introducir cultivos bacterianos en caso los microorganismos estén ausentes de modo natural en las muestras de agua a analizar; y finalmente verificar la evolución de la DBO en función del tiempo, puesto que durante los primeros días de análisis suele ocurrir la descomposición de la carga orgánica hidrocarbonada y pasados los ocho días suele producirse la eliminación de carga orgánica nitrogenada.

En este contexto, la vinculación entre el tiempo y la variación de la DBO se muestra en la Figura 1. Ello puede entenderse como disminución del requerimiento de oxígeno por actividad biótica de una muestra de agua, en función del tiempo transcurrido. Dicha relación señala que, a los cinco días de iniciado el ensayo, la DBO hidrocarbonada se consume aproximadamente en un 70 %; mientras que, a los ocho días, la eliminación de la materia orgánica hidrocarbonada decae e inicia la oxidación de los compuestos orgánicos nitrogenados, ello facilita el entendimiento sobre el tipo de materia orgánica que se está determinando en función del tiempo transcurrido. En la Figura 1 también se aprecia que la DBO total de un determinado cuerpo de agua, se determina en un lapso de tiempo aproximado de veinte días.

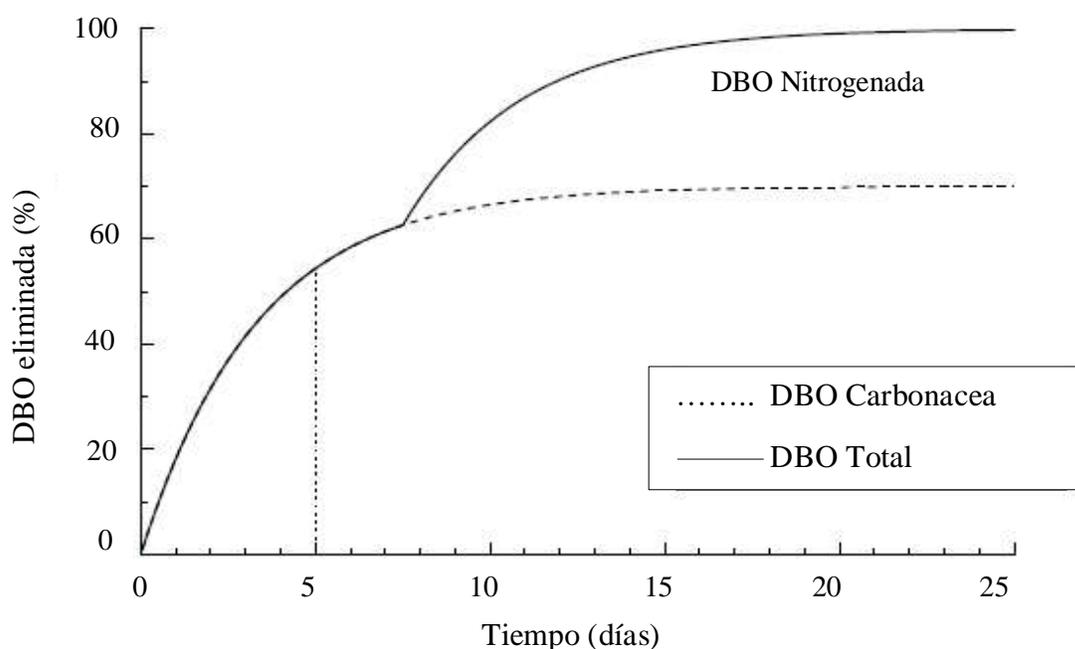


Figura 1. Valoración de la DBO en base al tiempo transcurrido. Fuente: Aznar (2000).

Por ende, el oxígeno demandado por la actividad bioquímica de los cinco primeros días de oxidación, más conocida como DBO_5 , nos permite estimar la carga orgánica hidrocarbonada alojada en las muestras de agua. Por tal motivo, supone el método más ampliamente usado por entidades gubernamentales y en trabajos de investigación, debido a sus múltiples aplicaciones, simplicidad y alto grado de representatividad que ofrecen sus resultados. Además, de la

temperatura y periodo de incubación establecidos, la DBO₅ se lleva a cabo en condiciones de oscuridad y a un nivel de pH alrededor de 7,2 (Mayarí *et al.*, 2005; Raffo y Ruiz, 2014).

a. Implicancia de la DBO₅ en la depuración de las aguas residuales

Raffo y Ruiz (2014) mencionan que la DBO₅ indica el grado de contaminación por materia orgánica putrescible y por ende la calidad del agua residual doméstica; por lo que viene a ser uno de los parámetros más relevantes en la purificación de este tipo de aguas residuales. Más aun, permite estimar cuantitativamente el oxígeno disuelto consumido por la fauna microbiana aerobia, en su esfuerzo por aprovechar la materia orgánica albergada en el agua. En ese sentido, cuanto mayor sea el contenido de sustancias putrescibles alojadas en el agua a tratar, mayor será el nivel de oxígeno requerido por la biota acuática para su aprovechamiento.

Por otro lado, Ramalho (2003) advierte que el paradero final de los residuos líquidos, sean tratadas o no, son los cuerpos de agua naturales o algún componente ambiental que tiene una cierta capacidad de tolerancia a la contaminación, la cual no debe rebasarse. Por lo que, es sumamente importante conocer el potencial de contaminación que poseen las aguas residuales que se vierten al ambiente; he aquí la relevancia de determinar la DBO₅ durante y tras la depuración de las aguas residuales, a fin de evitar repercusiones negativas en los componentes hídricos receptores como el agotamiento del oxígeno disuelto que poseen; dicho fenómeno se observa en la Figura 2.

Más aún, la Figura 2 describe la curva de disminución del oxígeno disponible en un componente acuático receptor, ante la incorporación de volúmenes de agua residuales con elevados niveles de carga contaminante putrescible en el corto tiempo; dicha descarga dinamiza la actividad microbiana y se produce un abrupto incremento de la DBO. De manera que, a mayor distancia entre el punto de vertimiento y el recorrido efectuado por el agua, el nivel de oxígeno disponible en el medio acuático se restablece.

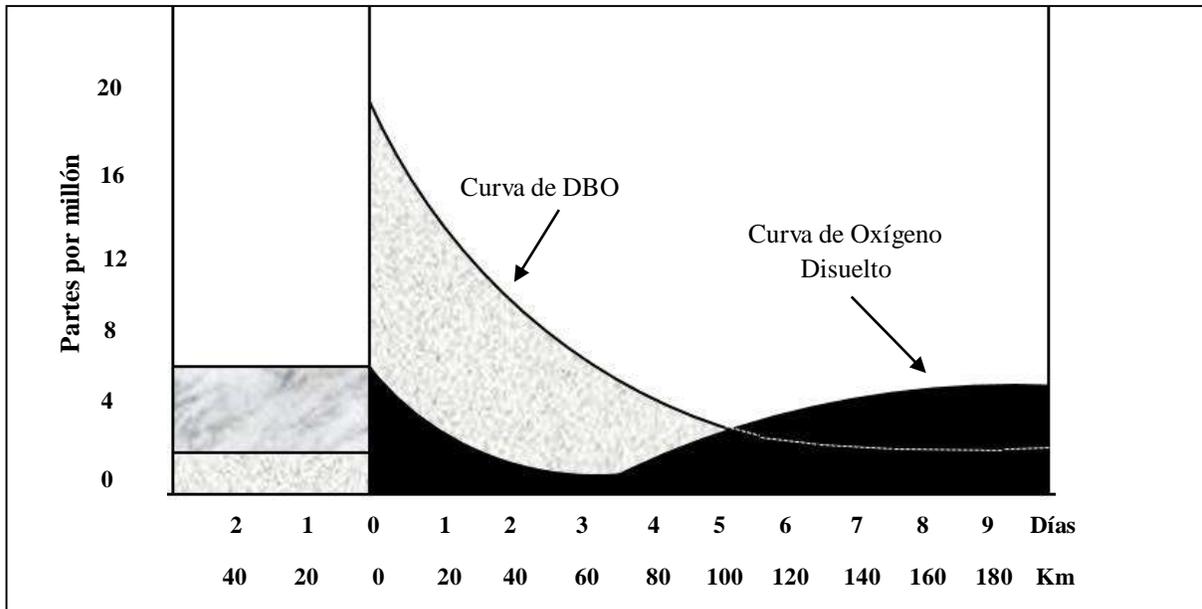


Figura 2. Curva de la DBO y oxígeno disuelto en un cuerpo de agua receptor. Fuente: Ramalho (2003).

No obstante, pese a que la demanda bioquímica de oxígeno de los cinco días (DBO_5) viene a ser el parámetro más utilizado en el estudio de las aguas residuales, teniendo en cuenta el factor tiempo, no es el único. Al respecto Orozco (2005) denota que, determinar el requerimiento de oxígeno en el agua en un tiempo superior a los cinco días permite un conocimiento más preciso sobre el contenido de materia orgánica del agua residual estudiada; tal es el caso de la DBO_7 , DBO_{10} o la demanda bioquímica de oxígeno determinada a los veinte días (DBO_{20}). Sin embargo, el factor tiempo limita seriamente la realización de estos análisis, por lo que la DBO_5 representa la opción más adecuada; además, tiene una representatividad comprobada que circunda el 70 %, ello implica que dicho valor porcentual de sustancias biodegradables son aprovechadas durante este lapso de tiempo.

1.2.5. Otros parámetros de interés en la depuración de las aguas residuales

Demanda química de oxígeno (DQO)

A aquella proporción de oxígeno disuelto, necesaria para aprovechar los componentes orgánicos alojados en el agua por medio de agentes químicos, se le conoce como demanda química de oxígeno (DQO). El agente químico por excelencia en este tipo de análisis es el dicromato de

potasio expuesto a altas temperaturas y en un medio con pH inferior a 7. Además, la DQO suele ser mayor a la DBO₅ debido a que en las aguas residuales, por lo general, existe mayor cantidad de compuestos oxidables químicamente que aquellos susceptibles a ser oxidados biológicamente. Ello permite establecer una relación entre ambos parámetros, con lo cual es posible inferir la naturaleza de los contaminantes del agua residual y el origen de esta (Raffo y Ruiz, 2014).

Sólidos totales

Sigler y Bauder (2017) identifican a los sólidos totales como la cuantificación de metales, minerales y sales que pueden estar presentes en un cuerpo de agua. Por su parte, Metcalf y Eddy (1995) sostienen que, analíticamente los sólidos totales de los desechos líquidos son todas las sustancias no volátiles presentes en las mismas; ello implica a la materia sedimentable, en suspensión, disuelta y materia coloidal. Además, el vertimiento de aguas residuales con altos contenidos de sólidos totales podría generar déficit de oxígeno en el medio y la acumulación de sedimentos, además de propiciar el desarrollo y proliferación de organismos patógenos; por otro lado, dado que los sólidos sedimentables suelen generar turbidez en el agua, la penetración de la luz se vería limitada y ello daría pie a una alteración en el normal establecimiento de la flora y fauna subacuática.

Potencial de hidrógeno (pH)

Para Gómez *et al.* (2008), el pH es un factor sumamente influyente en la disponibilidad de carbono y energía para las bacterias del género *Pseudomonas*, por lo que supone un factor determinante en el proceso de biorremediación con estos microorganismos; mismos que requieren valores de pH cercanos a la neutralidad o en su defecto en el rango de 6 a 8, para desarrollarse de manera óptima. Por otro lado, el autor indica que a valores de pH más alejados de la neutralidad (pH 7), los procesos de biorremediación son más lentos e ineficientes; adicionalmente, cabe destacar la incidencia que tiene la temperatura del agua con respecto al pH, la cual en un rango de 0 a 40 °C resulta inversamente proporcional, por lo que el incremento

de la temperatura incita al incremento del factor de disociación del agua y por ende a la disminución de los valores de pH.

Temperatura

La temperatura influye directamente en la disponibilidad de oxígeno en los entornos acuáticos residuales; es por ello que, para el desarrollo de microorganismos aerobios se debe mantener un control sobre este parámetro, dado que cuando el nivel térmico del agua se intensifica, la solubilidad del oxígeno disminuye y las reacciones químicas se incrementan, trayendo como consecuencia una falta de oxígeno en el medio. Por otro lado, la temperatura influye en la rapidez con la que se dan las reacciones químicas en el medio acuático; así, a niveles térmicos por encima de los 50 °C o inferiores a 15 °C la actividad microbiana decae, lo cual implica una reducción en el proceso de depuración biológica (Metcalf y Eddy, 1995). Ello guarda concordancia con lo descrito por Aznar (2000), quien indica que el alza en el nivel térmico del agua contribuye, por un lado, a que los sólidos sean más fáciles de disolver y por otro, a que la solubilidad de los gases disminuya. Adicionalmente, el autor sostiene que la actividad biológica en el agua se duplica o disminuye en la misma proporción por cada 10 °C de variación en este parámetro; no obstante, advierte que, a determinados valores extremos, la temperatura puede suponer una fuerte limitante para el desarrollo de determinados organismos acuáticos.

Coliformes termotolerantes

Acosta *et al.* (2008) señalan que actualmente resulta excesivamente difícil y costoso determinar la presencia de todos los microorganismos patógenos presentes en las fuentes de agua, por ende, se usan microorganismos altamente representativos de la contaminación denominados “Coliformes Termotolerantes”. En ese sentido, la presencia y concentración de estas bacterias en un determinado cuerpo de agua, supone un indicativo muy relevante de una posible contaminación con residuos fecales humanos, ya que el tracto intestinal humano es su principal hábitat.

Resulta paradójico que aquellos microorganismos que habitan en el ser humano puedan causarle daño. Sin embargo, como lo menciona Feachem *et al.* (1983), la afectación del hombre por bacterias coliformes es una realidad, puesto que gran cantidad de las enfermedades gastrointestinales que sufre el hombre, son originadas por estas bacterias. Por ende, en términos sanitarios, la ausencia de estas bacterias en aguas destinadas al uso agrícola o al consumo humano supone una garantía de la calidad de estas.

1.2.6. Las bacterias y sus características

Louis Pasteur y Robert Koch fueron los pioneros en sugerir que ciertas enfermedades del hombre se producían por microorganismos, abriendo la posibilidad para el estudio microbiano y su desarrollo posterior hasta nuestros días (Lacal, 2008). En cuanto a las bacterias, el autor sostiene que son microorganismos procariotas unicelulares con tamaños de entre 0,5 a 5 micrómetros; no obstante, existen contadas excepciones en cuanto al tamaño de las células bacterianas, como es el caso de *Thiomargarita namibiensis*, considerada la bacteria más grande, con un tamaño de 500 micrómetros. Además, entre las características más relevantes que presentan las bacterias, tenemos: la carencia de membrana nuclear, lo cual propicia que el material genético se encuentre enrollado sobre sí mismo; por otro lado, y a diferencia de las células eucariotas, las bacterias presentan peptidoglicano en la capa celular que las envuelve y se multiplican por bipartición, mecanismo que implica una reproducción asexual.

El dominio bacteria involucra a una extensa variedad de organismos procariotas; muchos de los cuales suelen ser microorganismos no patógenos, aunque también los hay aquellos que causan enfermedades, tal es el caso de *Escherichia coli*. En ese sentido, Madigan *et al.* (2009) indica que el *phylum* proteobacteria alberga la mayor cantidad de procariotas del dominio bacteria, ello se ve representado en la Figura 3; además, los autores resaltan a algunas especies de bacterias por su particularidad metabólica, como las quimiolitótrofas y fotótrofas, y a aquellas especies que poseen una notoria capacidad para biodegradar compuestos orgánicos o tóxicos, como es el caso de las *Pseudomonas*; mismas que tienen un nicho ecológico muy extenso, dado que se las puede encontrar en agua, suelo, plantas y animales.

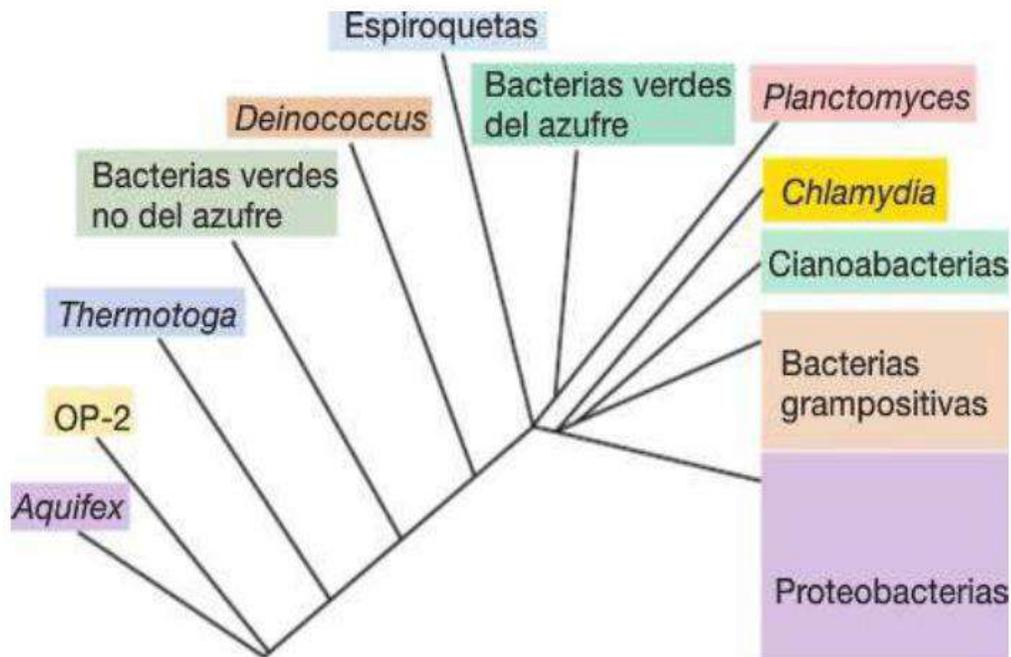


Figura 3. Representación del árbol filogenético del dominio bacteria, se resalta la división proteobacteria, la cual alberga el mayor número de especies. *Fuente:* Madigan *et al.* (2009).

Ahora bien, debido a que las bacterias son extremadamente diversas, Pérez y Mota (2006) indican que uno de los métodos más usados para diferenciarlas y clasificarlas es la tinción Gram. Esta técnica, además de posibilitar la identificación bacteriana, su agrupamiento y forma, permite diferenciar a aquellas bacterias con pared celular gruesa (Gram positivas que se tiñen de azul violeta), de aquellas con pared celular delgada (Gram negativa que se tiñen de rojo). Además, los autores mencionan que las diferentes especies bacterianas, ya sean Gram positivas o negativas, tienen estructuras comunes o permanentes tales como el ADN, la pared celular, la membrana celular o los ribosomas; al mismo tiempo poseen ciertas estructuras celulares variables, es decir, estructuras que se presentan en algunas bacterias, pero no en todas, ello debido a posibles ventajas selectivas o de resistencia particulares que han desarrollado respecto a otras. Al respecto, Madigan *et al.* (2009) acotan que un estudio minucioso de las superficies celulares revela notables diferencias entre la textura de las células Gram negativas y Gram positivas, tal como se representa en la Figura 4.

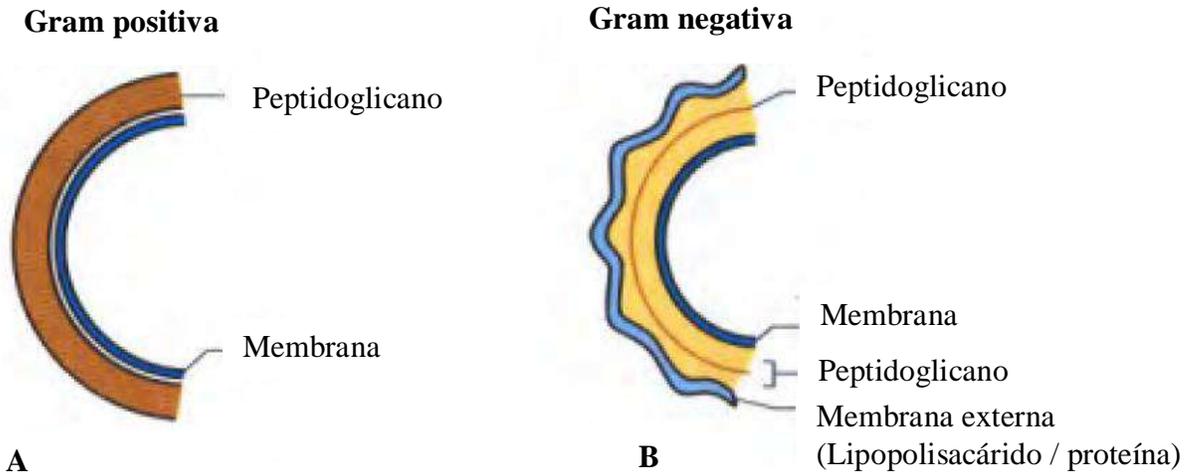


Figura 4. Representación esquemática de las paredes celulares: A. Gram positivas y B. Gram negativas. Fuente: Madigan *et al.* (2009).

En cuanto a la apariencia física bacteriana se refiere, Torres y Zuluaga (2009) agrupan a las bacterias en tres grupos morfológicos identificables como esféricas o cocos, en forma de bastoncillos y en formas helicoidales; los cuales, a su vez, se diversifican según el tipo de agrupamiento que presentan, ello se denota en la Figura 5. Al respecto, Villee (2003) sostiene que la clasificación bacteriana más afectiva y precisa se realiza teniendo en cuenta las características bioquímicas y fisiológicas, más que las características morfológicas, ya que muchas bacterias con formas totalmente similares pueden ser de tipos o especies distintas. No obstante, la autora hace énfasis en que las características morfológicas, han sido desde siempre y son una herramienta eficaz a la hora de identificar y aproximarse en el estudio de una determinada especie bacteriana, además de representar una práctica científica económica y técnicamente más accesibles.

Así, la Figura 5 muestra de manera general las tres apariencias morfológicas bacterianas; de las cuales podemos distinguir, por un lado; a las bacterias con forma esférica, que según su agrupamiento pueden ser cocos, diplococos, estreptococos, micrococos o sarcinas; por otro lado, están las bacterias con forma bacilar o de bastoncillos a las cuales se les denomina bacilos; mientras que aquellas que presentan forma física helicoidal son los espirilos o espiroquetas.

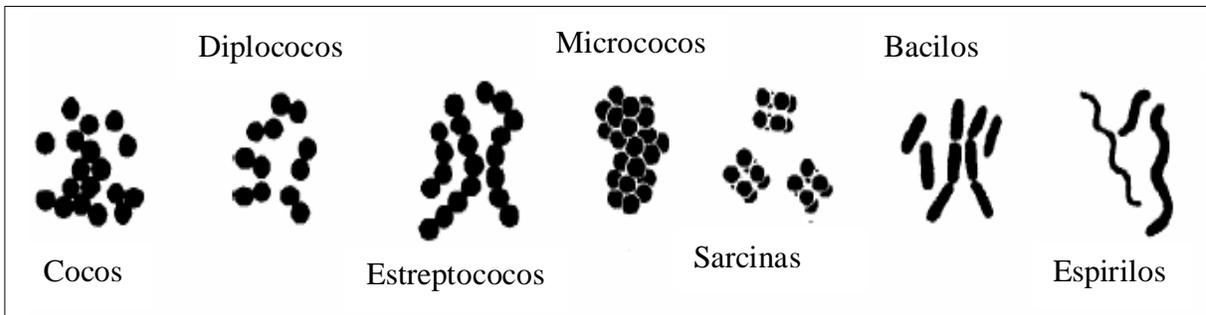


Figura 5. Apariencia física y agrupamientos bacterianos. Fuente: Torres y Zuluaga (2009).

Otras características de las bacterias descritas por Stanier *et al.* (1996) y Villee (2003) que son de interés para la presente investigación, aluden a que estos microorganismos poseen un sistema de membrana unitario con un espesor de entre 2 a 3 nm, por medio del cual puede realizar intercambios genéticos con otras bacterias; también mencionan que muchos de estos microorganismos tienen la capacidad de moverse gracias a los flagelos con los que cuentan. En lo concerniente a la reproducción bacteriana, los autores señalan que es de tipo asexual y por fisión binaria, lo cual implica la duplicación del ADN en regiones nucleares para posteriormente dividirse; dichos acontecimientos se dan a una rapidez extremadamente alta en las bacterias, tanto que en condiciones favorables una sola puede dar origen a 250 000 células en seis horas.

1.2.7. El género *Pseudomonas*

Las bacterias *Pseudomonas* son microorganismos Gram negativos de morfología bacilar. Se desarrollan de manera óptima en presencia de oxígeno, no obstante; se ha reportado la presencia de estas bacterias en espacios carentes de oxígeno; por lo que, a falta de este elemento utilizan el nitrato en sus procesos metabólicos. Además, estas bacterias reaccionan positivamente a las pruebas de catalasa y oxidasa. Otra de las características más resaltantes de las *Pseudomonas*, y en la que la bibliografía hace énfasis, es en su especial capacidad para aprovechar hasta cien (100) compuestos distintos como fuentes de carbono y energía, catalogándola como un microorganismo generalista y por ende con mayor poder adaptativo que otras bacterias (Lacal, 2008). En cuanto a la taxonomía del género *Pseudomonas*, Palleroni *et al.* (1973) realizaron una homologación de ácidos nucleicos de cepas de *Pseudomonas*, lo que les permitió agrupar diversas especies de este género en un grupo según el grado de similitud del ARN de cada

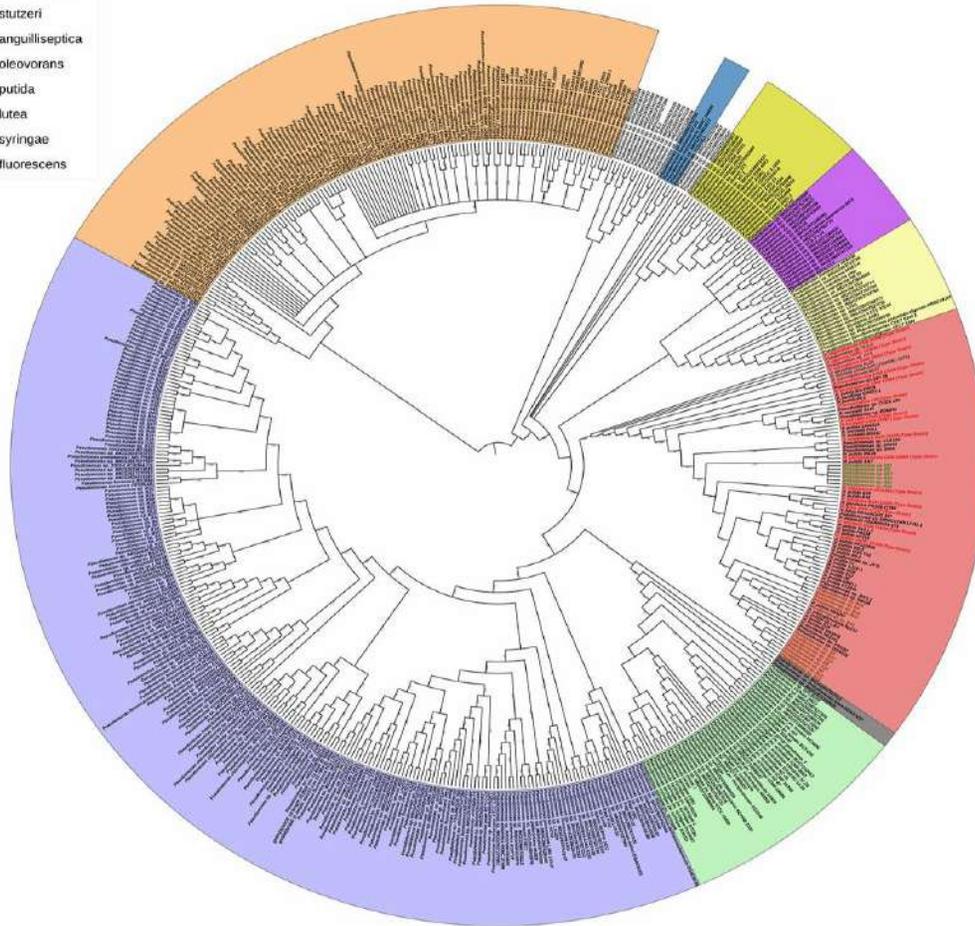
especie entre sí. Solo por mencionar algunas, el grupo estaba compuesto por las siguientes especies: (a) *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. angulata*, *P. mucidolens*, etc.

No obstante, un estudio más detallado fue llevado a cabo por Lopes *et al.* (2019), en la cual investigaron a las *Pseudomonas* y las diferencias que presentaban entre sí, desde el punto de vista metabólico y genómico, además de tener en cuenta la procedencia de cada especie. En ese sentido, los investigadores lograron agrupar un total de quinientos dieciocho (518) cepas, de las cuales resaltan el grupo de las *Pseudomonas putida*, ya que estas mostraron diferencias genómicas, pero sobre todo mostraron diferencias metabólicas asociadas a su procedencia; por lo que, aquellas que proceden del suelo tendrían una mayor capacidad para degradar compuestos aromáticos y residuos de pesticidas, a diferencia de aquellas bacterias provenientes de la rizosfera de la caña de azúcar, las cuales influirían en el desarrollo de la planta, estableciendo, incluso, una interacción de tipo simbiótica (planta – microorganismo).

En tal sentido, la Figura 6 muestra el árbol filogenético de máxima similitud, en la cual se establecen quince tipos de cepas asociadas a las *Pseudomonas putida* provenientes del suelo (color rojo), además de las cepas de referencia (color negro) y las cepas provenientes de la rizosfera (color verde). En base a ello, resulta evidente que el género *Pseudomonas*, como muchos otros generes bacterianos, presentan una alta variedad de especies, cada una con características particulares e importantes en el ámbito de la biotecnología ambiental (Loh y Cao, 2008).

A

- Pseudomonas groups**
- P. aeruginosa
 - P. resinovorans
 - P. stutzeri
 - P. anguilliseptica
 - P. oleovorans
 - P. putida
 - P. lutea
 - P. syringae
 - P. fluorescens



B

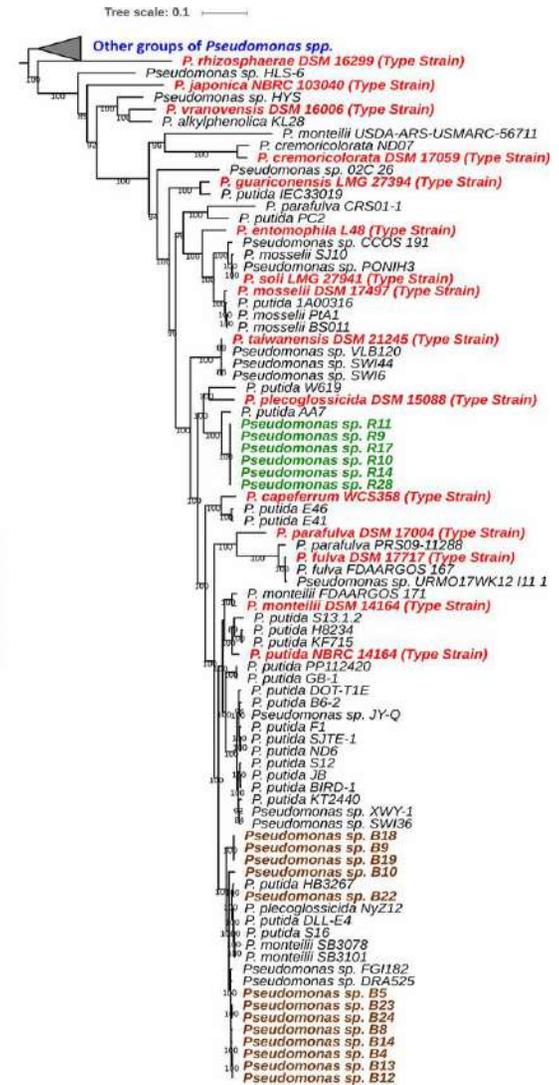


Figura 6. A. 518 cepas de *Pseudomonas* en Ocho grupos. B. Acercamiento al grupo de las *Pseudomonas putida* (grupo de color rojo): Fuente: Lopes et al. (2019).

a. *Pseudomonas putida*

La especie *Pseudomonas putida*, es un microorganismo bacteriano Gram negativo perteneciente a la familia *Pseudomonaceae* y a la clase de las γ proteobacterias; su taxonomía se detalla en la Tabla 5. Autores como Flórez (2016) sugieren que las *Pseudomonas putida* son microorganismos saprofitos del suelo, que tiene la capacidad de habitar diversos espacios y soportar condiciones ambientales cambiantes. Por otro lado, presentan una morfología bacilar y cuentan con flagelos, los cuales le permiten moverse. La célula bacteriana *P. putida* es un microorganismo aerobio con una longitud entre 1 y 2 micrómetros y un diámetro máximo de 0,8 micras (Niño, 2009).

Tabla 5

Taxonomía de Pseudomonas putida

Clasificación	Descripción
Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonaceae
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>Pseudomonas putida</i>

Fuente: Madigan *et al.* (2009) y Lacal (2008).

• **Características de importancia biotecnológica de *Pseudomonas putida***

Lacal (2008) califica a la bacteria *Pseudomonas putida* como muy versátil, puesto que requiere muy poca cantidad de nutrientes para su desarrollo, soporta amplios rangos de temperatura y pH y tiene la capacidad de formar biopelículas. Además, su rango de acción es muy amplio, ya que se la puede encontrar en el agua, suelo e incluso en plantas y animales; además, su tendencia a aprovechar cualquier fuente de carbono disponible la convierten en un organismo ideal para remover los compuestos carbonatados de las aguas residuales. En esa línea, Loh y Cao (2008) consideran a las bacterias *Pseudomonas putida* como microorganismos con alto potencial biotecnológico, debido a que no presentan características patógenas para plantas y animales, a diferencia de otras cepas de este género como *Pseudomonas aeruginosa*, más aún tienen la

capacidad de adaptarse en entornos adversos y catabolizar compuestos contaminantes. Esto guarda relación con estudios de proteómica efectuados sobre *Pseudomonas putida*, los cuales revelan que estos microorganismos sufren cambios en su fisiología celular y a nivel proteico cuando son expuestas a contaminantes o perturbaciones ambientales, al mismo tiempo que desarrollan proteínas y rutas catabólicas que le permiten adaptarse y crecer en ambientes adversos (Obeso, 2017).

El metabolismo que desarrolla *Pseudomonas putida* es propio de células complejas, por lo que este macroproceso se puede dividir de manera general en *procesos catabólicos*, para degradar compuestos aromáticos o desechos orgánicos albergados, por ejemplo, en los desechos líquidos; y *procesos anabólicos*, en los que sintetizan otros compuestos como proteínas o aminoácidos los cuales favorecen su crecimiento y desarrollo. No obstante, los procesos anabólicos y catabólicos no serían posibles sin la presencia de enzimas, las cuales aceleran las reacciones, actuando de manera específica sobre las sustancias. Por ende, debido a la importante labor que desempeñan las enzimas en el desarrollo bacteriano, cabe mencionar algunos factores ambientales que inciden directamente en dicha actividad; por un lado está la temperatura y el pH, los cuales a determinados valores podrían ocasionar una desnaturalización de las enzimas; por otro lado está la concentración de sustrato en el medio, lo cual regula la actividad enzimática, y finalmente esta la presencia de inhibidores, algunos de los cuales pueden ser metales pesados como el mercurio o el arsénico, que interrumpen el funcionamiento enzimático llegando a provocar, en algunos casos, la muerte de las células (Tortora *et al.*, 2007).

Al respecto, en la Figura 7 se muestran microfotografías de la apariencia que tienen las bacterias *Pseudomonas putida* cuando son expuestas a ambientes adversos; en cada una de ellas es posible diferenciar el grado de conexión existente entre célula y célula. Así, en “A” se observa que las bacterias se encuentran sueltas y no habría una aparente conexión entre ellas; por el contrario, en “B” se muestra la presencia de estructuras microtubulares que conectan a las células entre sí, incluso la morfología de las células se muestra más alargadas. Este fenómeno, según Obeso (2017), se lleva a cabo durante la formación de *biofilm* por parte de las *Pseudomonas*, cuando

se encuentran sometidas a condiciones metabólicas complejas; lo cual en definitiva supone un mecanismo de adaptación y supervivencia.

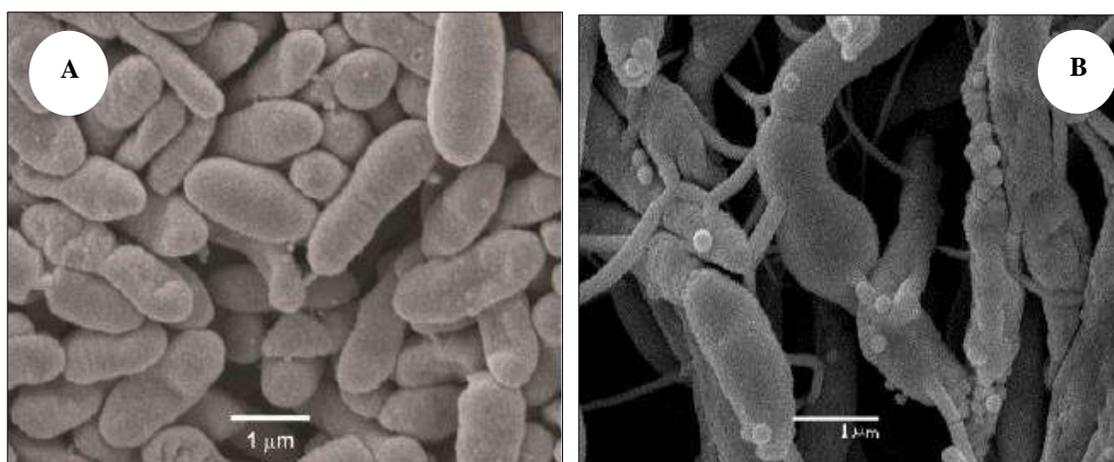


Figura 7. Microfotografía de *Pseudomonas putida*. A: Cepa de *P. putida* expuesta a un cierto nivel de ampicilina. B: Cepa de *P. putida* expuesta a altos niveles de antibióticos. Fuente: Obeso (2017).

1.2.8. La biorremediación como alternativa biotecnológica

Garzón *et al.* (2017) refiere que la biotecnología ambiental o biorremediación es, en nuestros días, la alternativa biotecnológica más prometedora de cara a alcanzar el desarrollo sostenible; puesto que implica la utilización de organismos vivos y su potencial metabólico para la remediación de espacios contaminados. A diferencia de los procesos de descontaminación convencionales en los que se suele generar material residual, la biorremediación hace posible reducir la toxicidad o eliminar por completo los contaminantes, generando muy poca y en ocasiones nula cantidad de nuevos residuos.

A su vez, para Ome y Zafra (2018), la depuración de las aguas residuales no está exenta a la biorremediación; más aún, los procesos biológicos que fundamentan la depuración de las aguas residuales, sobre todo domésticas, son llevados a cabo por microorganismos. No obstante, los investigadores advierten que la capacidad depuradora de estos microorganismos dependerá, en gran medida, del control de los parámetros ambientales, los cuales deben favorecer el desarrollo de los agentes degradadores mencionados.

En ese sentido, cabe indicar que los mecanismos de biorremediación aplicables en la depuración de las aguas residuales, más ampliamente descritos en la bibliografía científica son tres, y son abordados por Salinas *et al.* (2008) como *depuración natural*, *bioestimulación* y *bioaumentación*. Este último implica la adición de microorganismos o enzimas, en altas concentraciones, sobre las aguas residuales para su descontaminación; dichos microorganismos o bacterias usadas en estos procesos, pueden ser aislados de los mismos componentes ambientales a tratar. Por otro lado, Reyes *et al.* (2018) indican que los procesos de biorremediación por bioaumentación pueden verse potenciados con la inmovilización reversible o irreversible de las células bacterianas.

a. Biorremediación por bioaumentación de bacterias libres e inmovilizadas

Garzón y Barragán (2008) sostienen que los mecanismos de biorremediación de los residuos líquidos por bioaumentación, pueden realizarse mediante la inoculación de bacterias libres o la inmovilización de las mismas en determinadas matrices; sin embargo, la primera opción resulta menos efectiva en comparación a la segunda, por una serie de razones tales como; la vulnerabilidad de las células bacterianas a los cambios de temperatura, pH, oxigenación o a la presencia de contaminantes tóxicos; también por la dificultad que representa recuperar el material biológico tras su aplicación, lo cual ocasiona pérdida de la biomasa. Estas afirmaciones concuerdan con lo señalado por Reyes *et al.* (2018), quienes además sugieren la introducción de matrices que permitan la inmovilización y el desarrollo de mayor masa microbiana, con el objeto de dinamizar la actividad metabólica y proporcionar a los microorganismos mayor resistencia ante condiciones ambientales desfavorables.

1.2.9. Inmovilización bacteriana en los procesos de biorremediación

a. Mecanismos de inmovilización bacteriana

En cuanto a los mecanismos de inmovilización bacteriana, Silveira *et al.* (2013) reportan que, según la técnica por la cual se propicia la concentración microbiana, estas pueden ser: *inmovilización pasiva*, lo cual implica una adhesión de los microorganismos en la superficie de

las matrices, o *inmovilización activa*, en la cual las bacterias son fijadas con flocculantes o encapsuladas en geles como el alginato. Además, los autores hacen énfasis en la reversibilidad de ambos mecanismos, señalando que la inmovilización activa propicia una condición irreversible por el atrapamiento de las células dentro del soporte creando una barrera protectora para la misma; mientras que la inmovilización pasiva supone una condición reversible para los microorganismos, ya que estos pueden desprenderse de la superficie del sustrato en el que se encuentren adheridos.

Inmovilización pasiva

Garzón y Barragán (2008) mencionan que durante el proceso de inmovilización pasiva, sobre la superficies de las matrices, tienden a generarse sustancias poliméricas extracelulares, las cuales en gran proporción son proteínas, exopolisacáridos y ácidos nucleicos; dichas estructuras junto con el agua suponen alrededor del 75 a 85 % de lo que se conoce como biopelícula o *biofilm*, mientras que el porcentaje restante lo componen las células vivas que se van renovando constantemente para formar nuevos conglomerados. Los autores, precisan que el proceso de formación de las biopelículas se puede resumir en cuatro pasos distinguibles en la Figura 8: primero, los microorganismos se adhieren a la superficie de la matriz por medio de sus estructuras celulares; segundo, crecimiento celular y generación de polímeros extracelulares; tercero, crecimiento de la biopelícula; y cuarto, las células se desprenden de la biopelícula para colonizar nuevos espacios.

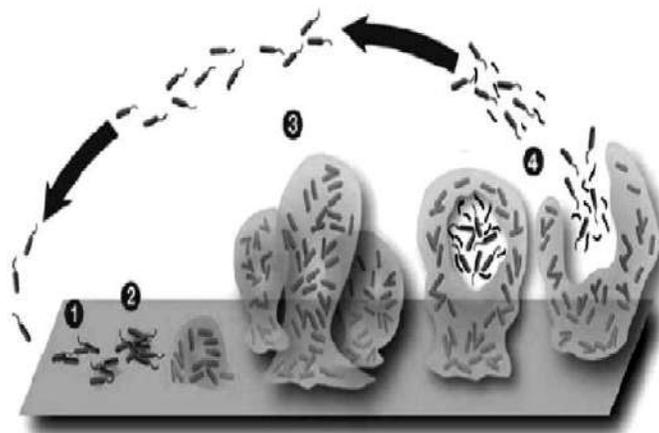


Figura 8. Proceso de formación de *biofilm*. Fuente: Garzón y Barragán (2008).

Inmovilización activa

Respecto a la inmovilización activa, Garzón y Barragán (2008) resaltan; por un lado, el uso de agentes floculantes, los cuales atrapan microorganismos en suspensión, dentro de los cuales pueden encontrarse aquellos que por sus rasgos fenotípicos no tienden a adherirse en las superficies; y por otro lado, indican que es usual el atrapamiento en geles de polímeros naturales o sintéticos, que posibilitan el encapsulamiento de gran cantidad de microorganismos y permiten el paso de nutrientes para su desarrollo.

b. Soportes utilizados en la inmovilización bacteriana

Para Reyes *et al.*, (2018), los soportes o matrices utilizados en la inmovilización bacteriana son muy diversos y se los puede diferenciar, de manera muy general, en dos grupos: por un lado, están aquellos soportes biodegradables, los cuales pueden ser residuos orgánicos, agroindustriales o fibras vegetales y, por otro lado, se encuentran las matrices no biodegradables o de muy poca biodegradación, como los vidrios, plásticos, polímeros sintéticos, rocas, etc. No obstante, dada la variedad de matrices que podrían usarse para la inmovilización bacteriana, resulta necesario prestar atención a los tipos de matrices y sus características, ya que estas juegan un rol de suma importancia para alcanzar una inmovilización bacteriana efectiva; es así que, para su elección se deben tener en cuenta a aquellos soportes que ofrezcan mayores ventajas en cuanto a: alta porosidad, de tal modo que permitan el intercambio de materia y energía para el desarrollo microbiano; amplia superficie de adhesión; estabilidad física y química, que haga frente a ambientes diversos y no reaccione a compuestos que podrían encontrarse en los medios experimentales o naturales (Garzón y Barragán, 2008).

Una de las matrices sintéticas que proporciona varios de las ventajas respecto a otras, al momento de la inmovilización bacteriana, son las espumas de poliuretano; al respecto, la Figura 9 permite advertir el mecanismo de inmovilización pasiva generado en esta matriz; en la cual, las células bacterianas se adhieren a la superficie de la espuma y dan cabida a un complejo celular capaz de producir exopolímeros. Por otro lado, la biodegradabilidad y porosidad de las

espumas de poliuretano propician, entre otras, una eficiente generación de biomasa bacteriana (Reyes *et al.*, 2018).

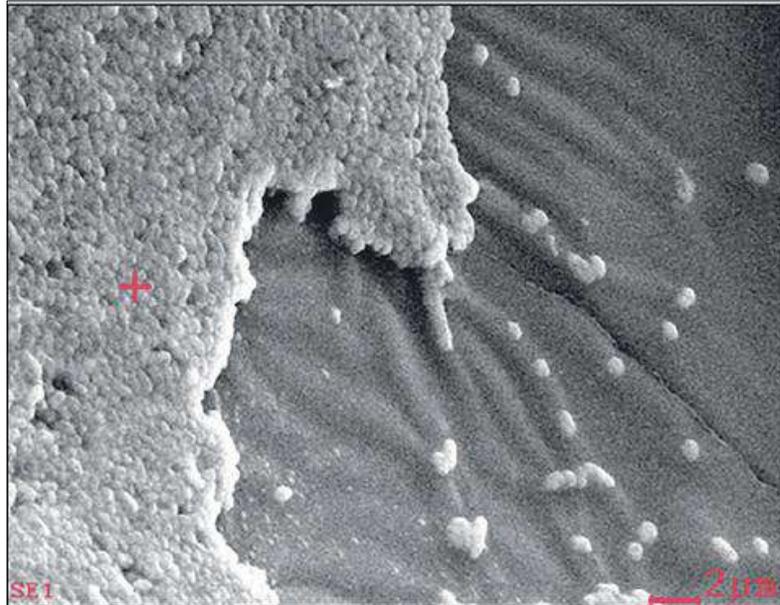


Figura 9. Fotografía de biopelícula formada en espuma de poliuretano, tomada mediante microscopía electrónica de barrido ambiental. *Fuente:* Reyes *et al.* (2018).

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño de la investigación

El presente trabajo es de tipo experimental, con un alcance explicativo, puesto que busca dar a conocer los efectos que tienen diferentes concentraciones de células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 sobre la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) de aguas residuales efluentes, y los posibles factores que propician dichos efectos. A la vez, el estudio es abordado con un enfoque cuantitativo, dado que implica la mensuración de variables apoyados por métodos estadísticos; finalmente cabe mencionar que el presente trabajo tiene un corte transversal, dado que la colecta de muestras fue llevada a cabo en una fecha única (Hernández *et al.*, 2014).

2.1.1. Lugar y fecha

El estudio implicó, por un lado, el desarrollo de trabajo en campo, llevado a cabo el día 27 de mayo del año 2021; dicha actividad tuvo como finalidad, el recojo de muestras y la medición de los parámetros de campo. Las muestras fueron colectadas en la infraestructura de salida de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) Collique; ubicada, políticamente, en la intersección de las avenidas Revolución y Francisco de Zela en la localidad de Collique, distrito de Comas, provincia de Lima, Perú; y geográficamente, en la costa central del Perú con coordenadas UTM WGS 84: 8682238 N y 281087 E, zona 18 sur; tal como se muestra en la Figura 11. Por otro lado, entre el 3 de mayo y el 7 de junio de 2021, se desarrollaron los trabajos experimentales y de laboratorio en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Universidad Católica Sedes Sapientiae (UCSS), emplazado en el cuarto piso del pabellón G3 del local Gonzales Prada de la UCSS, en el distrito de Los Olivos, provincia de Lima, Perú. Con coordenadas geográficas UTM WGS 84: 8673034,5 N y 274848,2 E, zona 18 sur.

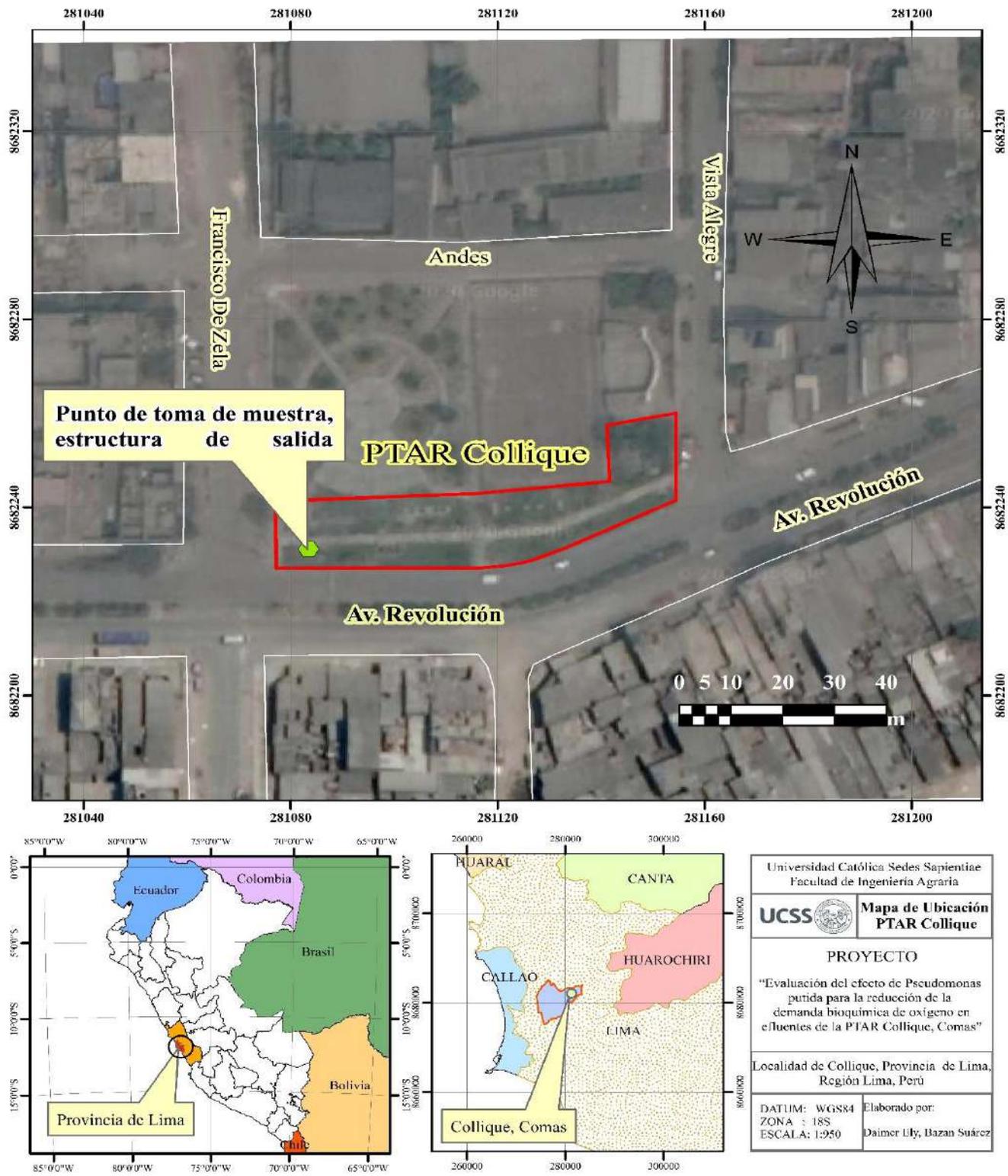


Figura 10. Mapa de ubicación de la PTAR Collique, en la localidad de Collique, distrito de Comas, Lima, Perú.

2.1.2. Materiales

Material biológico

El material biológico utilizado en la investigación fue la cepa bacteriana *Pseudomonas putida* ATCC 49128, derivada de la colección de cepas de la American Type Culture Collection ATCC, importada y comercializada por la empresa Gen Lab del Perú S.A.C, misma que se presenta en la Figura 11. El manejo y almacenamiento del material biológico, fue llevado a cabo según los lineamientos de la hoja de seguridad del producto, ello implicó la conservación en frío (entre 2 y 8 °C) hasta su utilización.



Figura 11. Cepa liofilizada de *Pseudomonas putida* derivada de ATCC 49128. A: Cepa en empaque KWIK STIK™. B: Ampolla en formato KWIK STIK™.

Materiales de campo

Etiquetas para muestras de agua residual, cinta adhesiva transparente, plumón indeleble, frascos de plástico, cooler, ice pack, vaso de vidrio de 250 ml, piseta, agua destilada, mandil, guantes de nitrilo.

Materiales de laboratorio

Frascos winkler de 300 ml, vasos de precipitado de 250 ml, tubos Corning de 15 ml, placas Petri 90 mm, asa bacteriológica, micropipetas de 10 – 100 μL y de 100 – 1000 μL , espumas de poliuretano, puntas de micropipeta de 1000 μL , matraces Erlenmeyer de 250 ml y 500 ml, microtubos de 2 ml, pipetas volumétricas de 10 ml, laminas portaobjetos, mechero de alcohol, espátula drigalsky, probetas de 100 ml y 500 ml, gradilla.

Equipos

- Multiparámetro portátil HANNA modelo HI 9813-6.
- Multiparámetro portátil HACH modelo HQ40d.
- Espectrofotómetro UV-Visible.
- Cámara de flujo laminar con suministro de aire vertical.
- GPS Garmin 60.
- Colorímetro portátil DR900 de la marca HACH.
- Termorreactor marca Rocker modelo CR-25.
- Microscopio óptico binocular Labor-Tech 910.
- Balanza analítica digital.
- Contador de colonias digital modelo FJ-3.
- Motor de aire de 4 salidas BIGBOY 10200.
- Refrigeradora.
- Autoclave vertical.
- Vórtex.
- Incubadora.

- Horno microondas.

Reactivos

- Sulfato de magnesio 7-hidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
- Cloruro de calcio (CaCl_2).
- Cloruro férrico 6-hidrato ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).
- Fosfato monopotásico anhidro (KH_2PO_4).
- Fosfato dipotásico anhidro (K_2HPO_4).
- Fosfato de sodio dibásico 7-hidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
- Cloruro de amonio (NH_4Cl).
- Soluciones *buffer* de pH 4 y pH 7.
- Viales de digestión con solución preparada para DQO.
- Cristal violeta.
- Reactivo de lugol.
- Alcohol acetona.
- Safranina.
- Aceite de inmersión.

Medios de cultivo

- Agar base *Pseudomonas* de la marca HIMEDIA REF M085-500G.
- Caldo tripticasa de soya de la marca CONDA.
- Pectona bacteriológica de la marca HIMEDIA REF RM001-500G.

Otros

Agua destilada, manguera para bomba de aire, alcohol líquido, algodón blanco, bolsas de polipropileno para laboratorio, parafilm, glicerina líquida, papel aluminio, papel kraft.

2.1.3. Descripción del experimento

Para alcanzar los objetivos propuestos, la ejecución del estudio fue llevado a cabo en dos etapas bien definidas, una etapa de campo y otra de laboratorio, las cuales se detallan de manera esquemática en las Figuras 12 y 13 respectivamente.

a) Etapa de campo

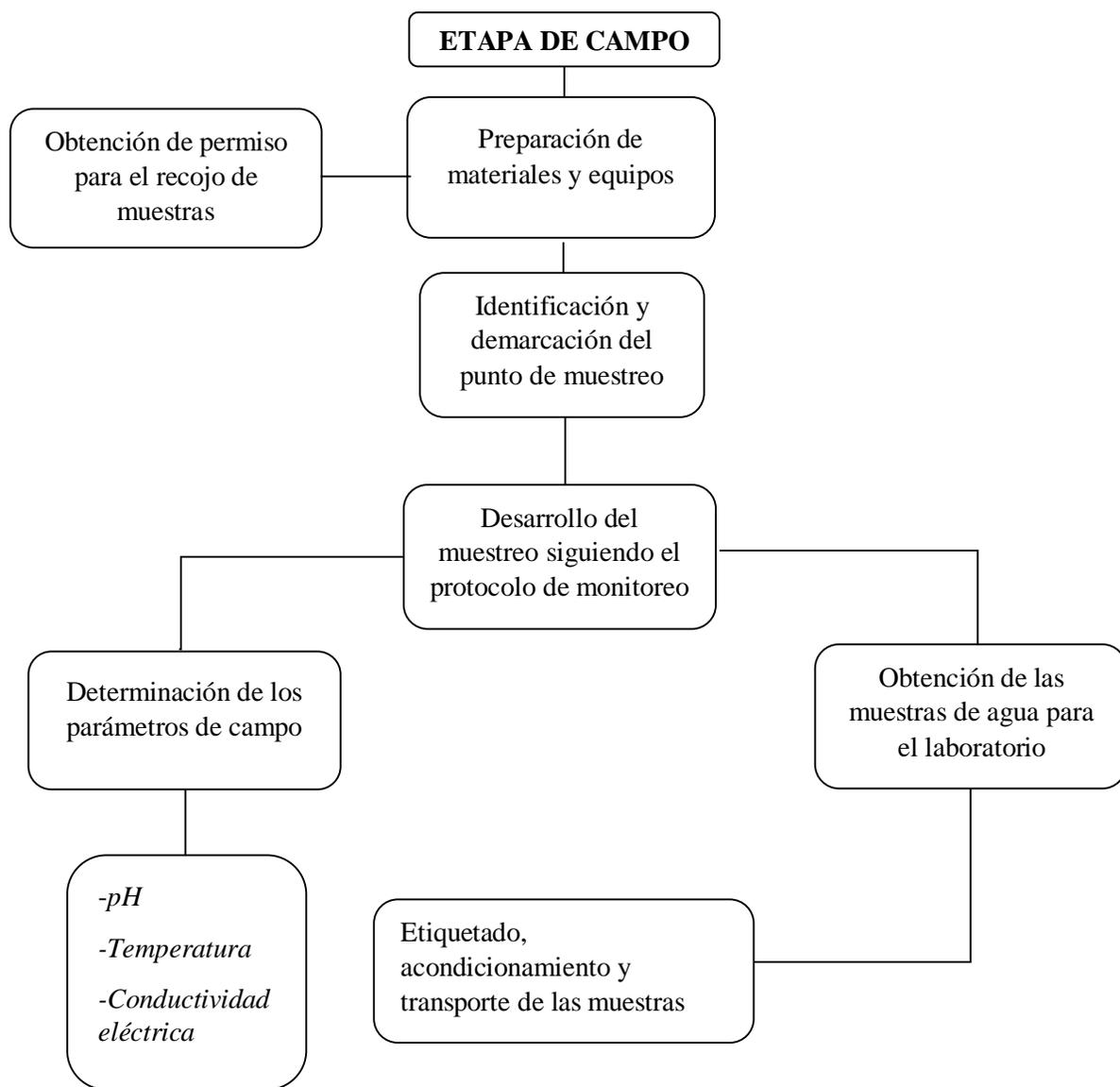


Figura 12. Descripción esquemática del procedimiento efectuado en la etapa de campo.

La Figura 12 describe, esquemáticamente, las principales actividades llevadas a cabo durante la etapa de campo, desde la obtención del permiso para el acceso a la infraestructura de tratamiento, hasta el recojo y transporte de muestras al laboratorio. A continuación, se detalla cada uno de los procedimientos realizados, los cuales se llevaron a cabo siguiendo el Protocolo de Monitoreo de los Efluentes de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales (en adelante Protocolo de Monitoreo), aprobado mediante Resolución Ministerial N° 273 (Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento [VIVIENDA], 2013).

- **Preparación de materiales y equipos para el muestreo**

La fase de premonitoreo implicó la preparación de materiales y equipos necesarios para el desarrollo del muestreo (dichos materiales se enumeraron en la sección 2.1.2 del presente documento); los cuales se adquirieron y prepararon con antelación a la jornada de campo; además, se realizó la verificación del funcionamiento del multiparámetro HANNA modelo HI 9813-6, con las soluciones de calibración propias del equipo para pH 4, pH 7 y para conductividad eléctrica 1400 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Por otro lado, se gestionó el permiso para el acceso a las instalaciones de la PTAR Collique, mismo que fue concedido por la Sub Gerencia de Áreas Verdes de la Municipalidad Distrital de Comas.

- **Ubicación y registro del punto de muestreo**

El punto en el cual se colectaron las muestras estuvo ubicado en la penúltima de las 12 cámaras que conforman la estructura de tratamiento de la PTAR Collique, distrito de Comas, provincia y departamento de Lima, tal como se observa en la Figura 13. La elección de dicho punto en la cámara 11 y no exactamente en la estructura de salida de la PTAR se debió a que en la última cámara (cámara número 12) se efectuaba la cloración del agua residual tratada, lo cual dificultaría el desarrollo de los trabajos experimentales. Es así que, haciendo uso del GPS Garmin 60, el punto en el cual se realizó la colecta de muestras fue demarcado en las coordenadas UTM WGS 84: 8682238 N y 281087 E, zona 18 sur.



Figura 13. Punto de muestreo, penúltima cámara de la infraestructura de tratamiento.

- **Recojo de muestras y determinación de los parámetros de campo**

El muestreo se efectuó según el Protocolo de Monitoreo de la Calidad de los Efluentes de PTAR. Por lo que, en un primer momento se extrajo una alícuota de agua, del punto previamente demarcado, en un vaso de precipitados de 250 ml y se determinaron los niveles de pH, temperatura y conductividad eléctrica; tal como se aprecia en la Figura 14. Tras ello se procedió a enjuagar los envases de plástico de primer uso y llenarlas con agua muestra situada en la parte central de la cámara de tratamiento. El volumen de muestra colectada fue de 7 litros, contenidos en 4 envases plásticos.



Figura 14. Medición de los parámetros de campo. A: Limpieza del electrodo tras cada medición. B: Determinación de la conductividad eléctrica con equipo ANNA modelo HI 9813-6 previamente calibrado.

- **Etiquetado y preservación de las muestras**

Una vez colectadas las muestras de efluente líquido, fueron rotuladas según el formato de etiqueta del Anexo V del Protocolo de Monitoreo de la Calidad de los Efluentes de las Plantas de Tratamiento de las Aguas Residuales Domésticas; Figura 15. Posteriormente, durante el traslado al laboratorio se desarrolló preservación física utilizando un *cooler* con *ice pack* para mantener las muestras a bajas temperaturas (VIVIENDA, 2013).



Figura 15. Etiquetado de muestras.

b) Etapa de laboratorio

Esta etapa consistió, por un lado, en la obtención y activación de la cepa bacteriana *Pseudomonas putida* 49128, así como de la determinación de su crecimiento; por otro lado, se determinaron los parámetros de interés en los efluentes provenientes de la PTAR Collique, al mismo tiempo que se acondicionaron las unidades experimentales y el espacio que estas ocuparían. Una vez que estos trabajos se llevaron a cabo, se procedió a desarrollar el trabajo experimental, inoculando las muestras de agua residual con las células bacterianas de *Pseudomonas putida*. Finalmente, tras haber realizado el seguimiento respectivo durante los cinco días que duró el experimento, se procedió a determinar los parámetros de interés. Cada

una de las actividades clave que forman parte de esta etapa, se mencionan de manera esquemática en la Figura 16 y posteriormente se desarrollan con mayor detalle.

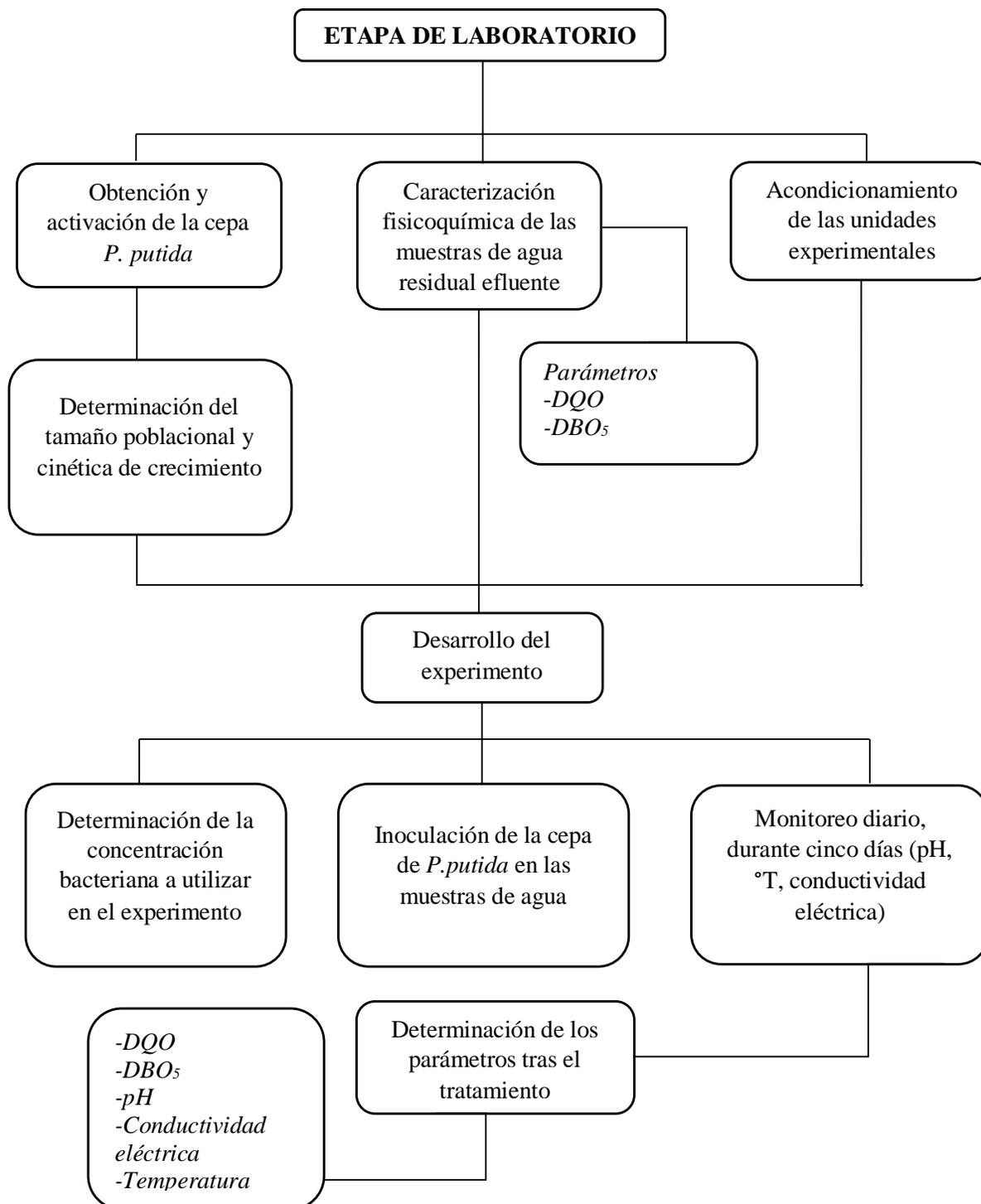


Figura 16. Descripción del procedimiento efectuado en la etapa de laboratorio.

- **Activación de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128®**

La cepa bacteriana fue activada en medio sólido, usando Agar Base *Pseudomonas* como sustrato de cultivo, debido a que es un medio que permite el óptimo crecimiento de este microorganismo (Johnsen y Nielsen, 1999). Cabe señalar que el agar en polvo usado en el presente estudio fue de la marca Himedia REF M085-500G.

La preparación del medio de cultivo implicó el uso de agar, glicerol y agua destilada en proporciones de 24,2 g; 5 ml y 500 ml; los cuales fueron mezclados en matraces Erlenmeyer y calentados en horno microondas para lograr su homogenización. Tras ello se realizó la esterilización de materiales y medios de cultivo en autoclave, durante un periodo de 15 minutos, a nivel térmico de 121 °C y a 15 libras de presión. Posteriormente, el medio de cultivo fue vertido en placas Petri, y dejado en reposo hasta su enfriamiento; dicho procedimiento es esquematizado en la Figura 17 (Aquiahuatl *et al.*, 2012).

A la vez, la cepa bacteriana *Pseudomonas putida* ATCC 49128 fue retirada del refrigerador para propiciar su equilibrio a temperatura ambiente. Luego, la inoculación de la cepa en el sustrato de cultivo sólido fue llevada a cabo siguiendo el instructivo de los empaques KWIK-STIK™, el cual se resume en los siguientes pasos: (a) se liberó el líquido hidratante situado en la parte superior de la ampolla; (b) tras ello se realizó la trituration del sedimento que contenía la cepa, alojado en la parte inferior de la ampolla; (c) posteriormente, se presionó la parte inferior de la ampolla para lograr la saturación del hisopo y (d) una vez que el hisopo estuvo saturado, se realizó la siembra del microorganismo por el método de estría simple en el medio de cultivo sólido. Finalmente, las placas Petri de 90 mm, que albergaban a la cepa inoculada en medio sólido, fueron rotuladas y puestas a incubar a 30 °C durante 48 horas, como se muestra en la Figura 18.

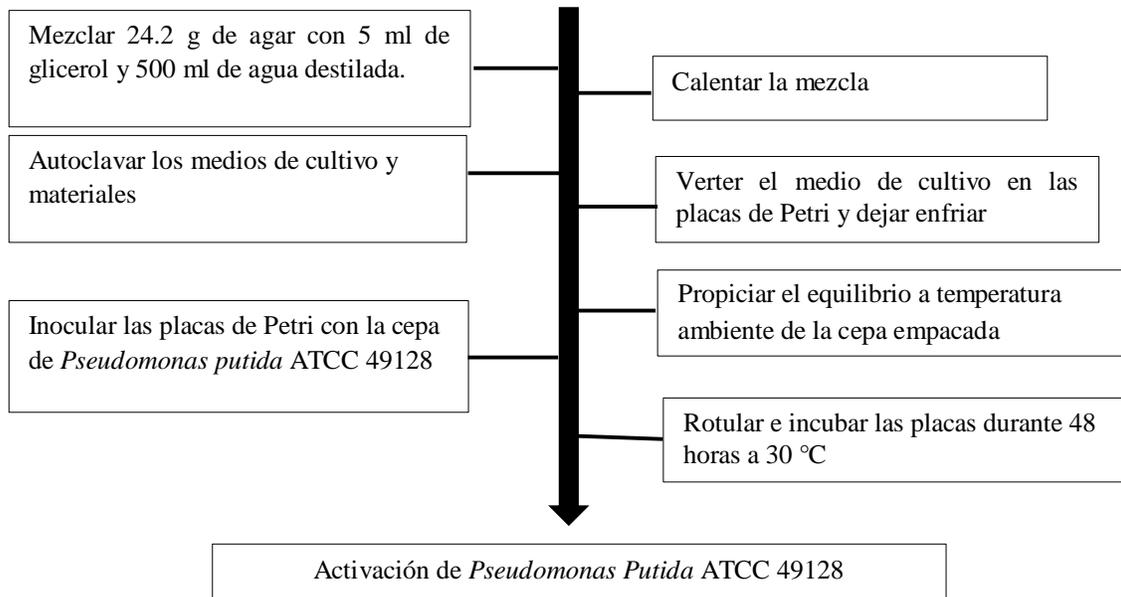


Figura 17. Flujograma de actividades para la activación de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128. Fuente: Elaboración propia, a partir de (Aquiahuatl *et al.*, 2012).

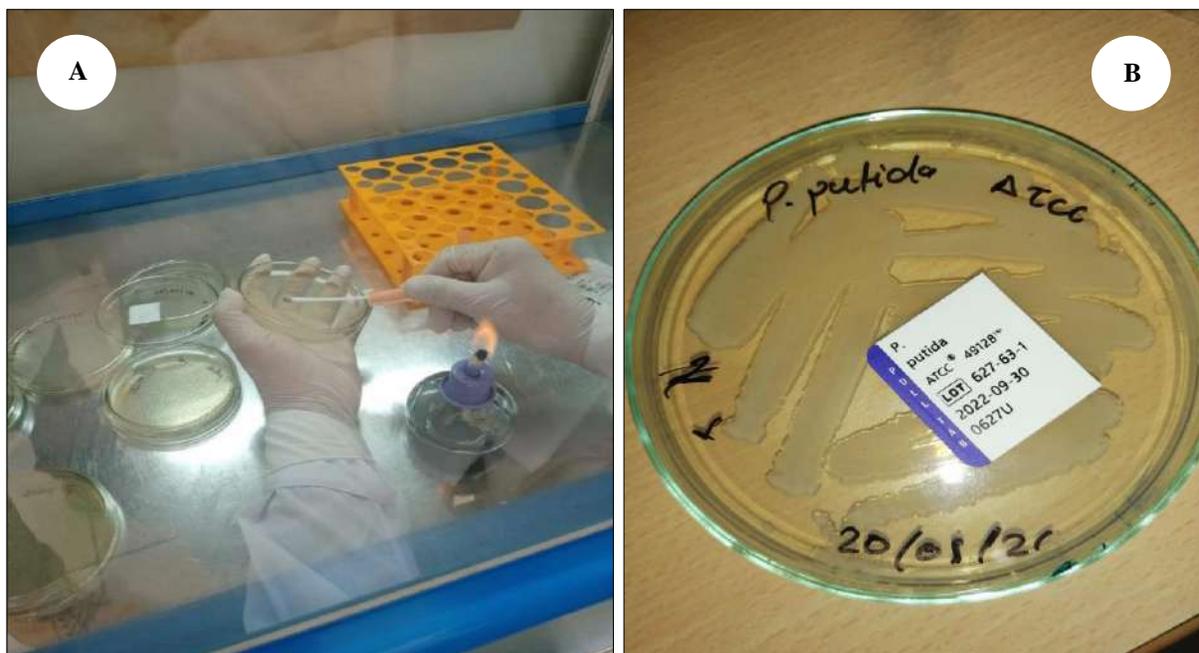


Figura 18. Activación de *Pseudomonas putida* ATCC 49128. A: Inoculación de la cepa en medio de cultivo sólido. B: Aparición de colonias tras 48 horas de incubación a 30 °C.

- **Determinación de la cinética de crecimiento de *Pseudomonas putida* ATCC 49128**

Una vez que la población bacteriana de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 activada en medio sólido, fue lo suficientemente notoria; se realizó la tinción Gram para descartar contaminación alguna. Habiendo verificado la pureza de la cepa, se procedió a realizar el conteo de colonias y determinar la cinética de crecimiento; para tal fin se adoptó el método de dilución y siembra en placa, el cual implicó realizar diluciones seriadas y la posterior siembra en placas de Petri previamente preparadas; además, de manera complementaria se aplicó el método turbidimétrico, haciendo uso del equipo espectrofotómetro para medir los niveles de absorbancia en los medios de cultivo líquido con y sin inóculo bacteriano (Aquiahuatl, y Pérez, 2004; Aquiahuatl *et al.*, 2012 y Bustos, 2017).

Para el desarrollo de los métodos utilizados en el presente estudio, fue necesario propiciar el crecimiento de la cepa bacteriana en un medio líquido. En ese sentido, haciendo uso de dos (2) matraces Erlenmeyer con capacidad volumétrica de 250 ml, se prepararon 150 ml de medio de cultivo líquido, el cual estuvo constituido por caldo tripticasa de soya y agua destilada, en proporciones de 30 g por cada 1000 ml respectivamente. Las mezclas fueron calentadas en horno microondas hasta lograr su homogenización y posteriormente fueron esterilizadas en autoclave. A continuación, haciendo uso de un asa bacteriológica debidamente esterilizada se tomó una asada de bacterias *Pseudomonas putida* previamente activadas en placas Petri, para ser depositadas en un matraz con medio de cultivo líquido, el cual se encontraba a una temperatura alrededor de los 30 °C. Por lo que se tenía un matraz con 150 ml de medio líquido inoculado con la cepa *P. putida* y un segundo matraz con contenido de 150 ml de medio sin inóculo, el cual fue utilizado como “medio blanco” para las mediciones de los niveles de absorbancia en el espectrofotómetro.

Finalmente, una hora después de que el matraz con medio líquido fue inoculado con cepa bacteriana y puesto a incubar a 30 °C, se procedió a extraer la primera muestra para medir su nivel de absorbancia y realizar la dilución y siembra en Placa; tras ello, los procedimientos

propios de cada método fueron desarrollados cada 60 minutos por un lapso continuo de 11 horas. Cabe precisar que, para el desarrollo de las diluciones seriadas se agregó 100 μL de medio líquido inoculado con *Pseudomonas putida*, en un microtubo con 900 μL de agua pectonada estéril; dicho procedimiento fue realizado de manera seriada hasta obtener una dilución de 10^{-7} en las tres primeras horas; mientras que desde la cuarta a la sexta hora, las diluciones fueron hasta 10^{-8} ; así, entre la séptima y novena hora se realizaron diluciones hasta 10^{-9} ; y finalmente, las muestras tomadas a la hora 10 y 11 fueron diluidas hasta 10^{-10} . Tras efectuarse las diluciones, se tomaron 100 μL de cada uno de los microtubos que contenían las tres últimas diluciones y se inocularon por duplicado en placas Petri; posteriormente, con el uso de una espátula drigalsky estéril, el inóculo fue extendido en la superficie del medio sólido y puesto a incubar a 30 °C por 24 horas. Tras ello, se realizó el conteo directo en UFC/ml (Aquihuatl, y Pérez, 2004; Bustos, 2017).

Por otro lado, la medición del nivel de absorbancia de las muestras tomadas cada hora implicó; en un primer momento, verter 1 ml del medio de cultivo sin inóculo “medio blanco”, en la cubeta del espectrofotómetro y realizar la medición para regular el nivel de transmitancia (100 %) y absorbancia (0.000) a un periodo espacial de 600 nm. En un segundo momento, se procedió a medir el nivel de absorbancia de 1 ml de medio de cultivo inoculado con la cepa bacteriana, ello se esquematiza en la Figura 20. De este modo, el crecimiento poblacional *P. putida* incrementó el grado de turbidez y por ende los niveles de absorbancia (Figura 19).

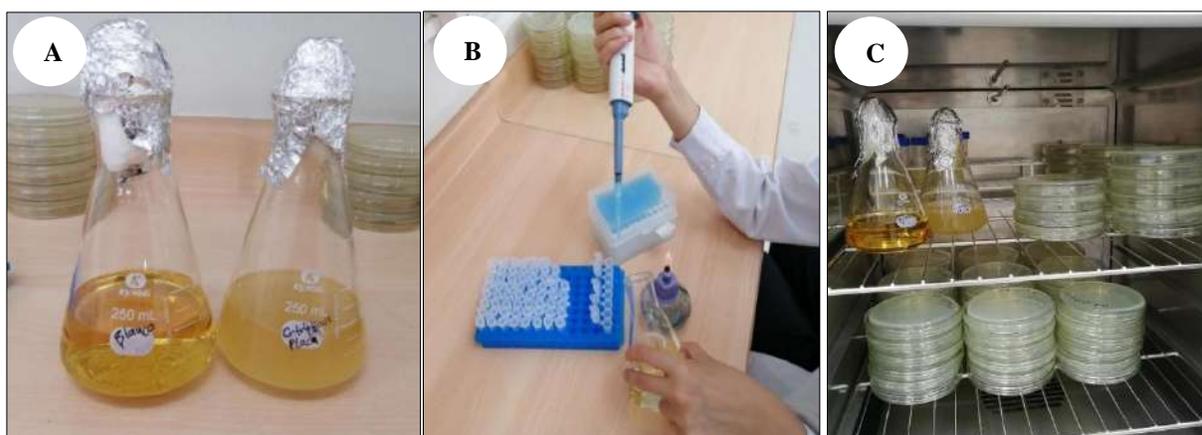


Figura 19. A: Medios de cultivo “blanco” y medio inoculado con *Pseudomonas putida* ATCC. B: Diluciones seriadas a muestra extraída del medio líquido con inóculo bacteriano. C: Placas Petri en incubación a 30 °C.

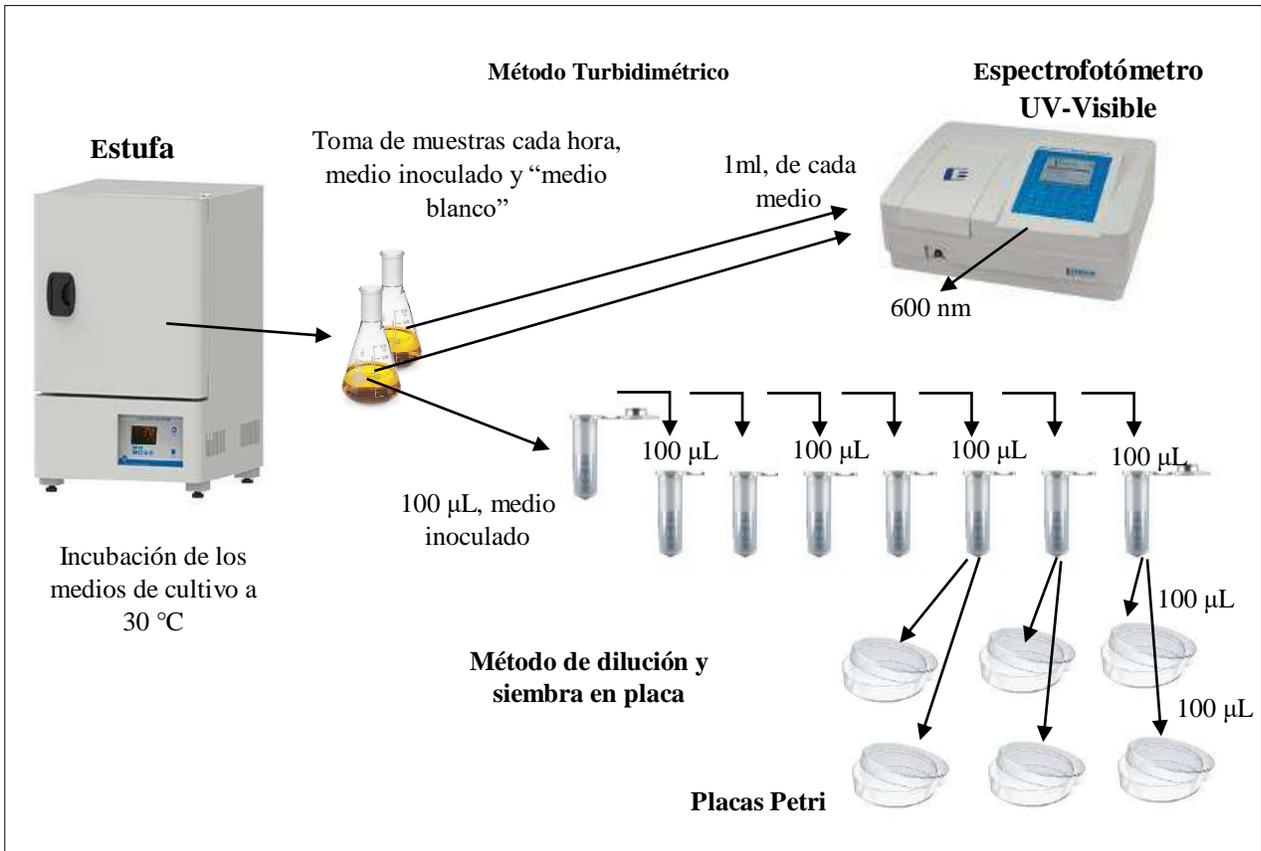


Figura 20. Representación gráfica de los trabajos realizados como parte de los métodos turbidimétrico y de dilución y siembra en placa. Fuente: Elaboración propia, a partir de (Bustos, 2017).

Con los datos recabados se calcularon los siguientes parámetros cinéticos, mismos que caracterizan el crecimiento de *Pseudomonas putida*: tasa máxima de crecimiento, el tiempo de duplicación y capacidad de carga (Sánchez, 2018).

Tasa máxima de crecimiento:

$$N_t = N_0 e^{\mu t}$$

Donde:

N_t : Población final

μ : Tasa de crecimiento exponencial

N_0 : Población inicial

t : Tiempo transcurrido

e : Constante neperiano

Tiempo de duplicación (td):

$$T = \frac{\text{Ln}(2)}{r}$$

Donde:

r: Tasa de crecimiento exponencial

Capacidad de carga (k):

$$Nt = \frac{K}{1 - \left(1 - \frac{K}{N0}\right) e^{-\mu t}}$$

Donde:

Nt: Población en el tiempo t

μ : Tasa máxima de crecimiento

k: Capacidad de carga del cultivo

- **Caracterización fisicoquímica de las muestras**

Los efluentes provenientes de la PTAR Collique, fueron caracterizados en base a la determinación de los parámetros demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) y demanda química de oxígeno (DQO), además, se tuvieron en cuenta los parámetros determinados en campo (conductividad eléctrica, pH y temperatura).

- **Determinación de los parámetros de estudio**

La medición de cada uno de los parámetros citados anteriormente, se llevaron a cabo haciendo uso de equipos, materiales y reactivos sugeridos en los “Métodos Normalizados para el Análisis

de Aguas Potables y Residuales” (APHA *et al.*, 1992). Dichos procedimientos se describen a continuación:

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅)

La determinación de este parámetro conllevó el uso de frascos Winkler de 300 ml, los cuales albergaron la muestra a un volumen deseado y permitieron expulsar con exactitud el excedente de la misma, gracias a los tapones de vidrio esmerilado que poseen. El procedimiento completo implicó el desarrollo de los siguientes pasos: (a) se prepararon los reactivos a ser utilizados en el agua de dilución, dichos reactivos estuvieron constituidos por una solución de tampón fosfatada (8,5 g KH₂PO₄; 21,75 g K₂HPO₄; 33,4 g Na₂HPO₄·7H₂O; 1,7 g NH₄Cl diluidos en 1 L de agua destilada), y tres soluciones con contenido de nutrientes (22,5 g MgSO₄·7H₂O; 27,5 g CaCl₂ y 0,25 g FeCl₃·6H₂O diluidos cada uno en 1 L de agua destilada); (b) con los cuatro reactivos preparados y almacenados en frascos de color ámbar, se efectuó la combinación con agua destilada en proporciones de 1 ml de cada reactivo, por cada litro de agua destilada, constituyendo así el agua de dilución, misma que fue sometida a aireación durante 1 hora, como se muestra en la Figura 21; (c) posteriormente, volúmenes determinados de agua muestra fueron pipeteados en los frascos Winkler según los porcentajes de dilución deseados, tras ello se completó el volumen máximo del frasco con agua de dilución, se tapó y se agitó para lograr su homogenización; (d) seguidamente, se midió el oxígeno disuelto (OD) de cada frasco, valiéndose del método de electrodo de membrana, para ello se utilizó el equipo multiparámetro HACH modelo HQ40d con sonda de oxígeno disuelto; (e) finalmente, se completó el volumen de muestra desplazado con agua de dilución y se puso a incubar a 20 °C en condiciones de oscuridad, durante 5 días. Tras ello se calculó la DBO₅ aplicando la fórmula siguiente:

$$DBO_5 \text{ mg/L} = (OD_{\text{inicial}} - OD_{\text{final}}) / P$$

Donde:

OD: Oxígeno disuelto.

P: Proporción decimal del volumen de muestra utilizada.



Figura 21. A: Aireación del agua de dilución. B: medición del Oxígeno Disuelto (OD) en los frascos winkler, con equipo HACH modelo HQ40d debidamente calibrado.

Demanda química de oxígeno (DQO)

Dicho parámetro fue determinado por el método colorimétrico, en el cual fueron utilizados el colorímetro portátil DR900 de la marca HACH y el termorreactor marca Rocker modelo CR-25. En ese sentido, tal como se muestra en la Figura 22, el ensayo se efectuó de la siguiente manera: (a) se adquirieron viales con solución preparada de la empresa SQA Soluciones Químicas Ambientales SAC, los cuales contenían 1,5 ml de solución digestora ($K_2Cr_2O_7$, H_2SO_4 y $HgSO_4$) y 3,5 ml de solución ácida (H_2SO_4 y Ag_2SO_4) para cada vial, tal como lo sugiere (APHA *et al.*, 1992); (b) posteriormente, tras agregar 2,5 ml de agua muestra en los viales con solución preparada, estos fueron tapados y removidos suavemente para homogenizar su contenido; (c) paso siguiente, los viales preparados y con contenido de agua muestra, fueron calentados por un lapso de 2 horas a $150\text{ }^\circ\text{C}$ en el termorreactor, junto a otros viales que únicamente contenía solución preparada “medio blanco”; (d) tras ello, los viales se dejaron enfriar en posición de reposo por 3 horas; (e) finalmente, y haciendo uso del “medio blanco” se midieron los niveles de DQO en mg/L, haciendo uso del colorímetro portátil HACH modelo DR900.



Figura 22. A: Vertido de 2,5 ml de agua muestra en cada vial. B: Viales de DQO con intervalos de 2-80 mg/L (ubicados adelante) y 20-800 mg/L (ubicados atrás), antes del proceso de termorreacción.

pH

Para determinar el pH de las muestras, se utilizó el multiparámetro HANNA modelo HI 9813-6; el cual fue calibrado antes de cada fecha de medición haciendo uso de las soluciones *buffer* de pH 4 y 7, propios del equipo. Además, cabe mencionar que se utilizó agua destilada para la limpieza del electrodo de membrana entre cada medición.

Conductividad eléctrica

La determinación de este parámetro se llevó a cabo por electrometría, haciendo uso del multiparámetro tipo HI 9813-6 de la marca HANNA. Tras cada medición se tuvo en cuenta la limpieza del electrodo con agua destilada.

Temperatura

Para medir el nivel térmico de las muestras en campo y en laboratorio, también se usó el multiparámetro tipo HI 9813-4 de la marca HANNA.

- **Acondicionamiento de las unidades experimentales**

Las unidades experimentales se muestran en la Figura 23, estas estuvieron conformadas por 12 matraces Erlenmeyer de 250 ml, los cuales fueron lavados y esterilizados para su uso etiquetado y proceder con el desarrollo del experimento; del mismo modo los cubos de espumas de poliuretano utilizados en el ensayo, fueron lavados tres veces, secados en horno microondas y esterilizados en autoclave a 121 °C y 15 psi de presión (Reyes *et al.*, 2018).



Figura 23. Acondicionamiento de las unidades experimentales (lavado y esterilización de materiales).

- **Ejecución del experimento**

El experimento dio inicio con la inoculación de células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128® en razón de 1×10^8 UFC/ml correspondiente a la tercera hora de crecimiento, y en volúmenes de medio líquido determinados para cada tratamiento; el T1 fue inoculado con 1 ml, el T2 con 1,5 ml y el T3 con 2 ml, de tal modo que, una vez dispuestos en el medio de tratamiento supongan concentraciones de 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$ y 2×10^8 UFC/ml, respectivamente. Previamente, el agua extraída para las muestras y los cubos de espumas de poliuretano habían sido dispuestos en los matraces Erlenmeyer de 250 ml, conformando así el material experimental de la investigación. El experimento tuvo una duración de 5 días, durante los cuales se realizaron mediciones diarias de los parámetros pH, conductividad eléctrica y temperatura,

haciendo uso del equipo multiparámetro ANNA modelo HI 9813-4. Cabe precisar que el ensayo se ejecutó a un nivel de temperatura homogéneo de 30 °C y en aerobios, únicamente con tapones de algodón; además, no se le proporcionó movimiento ni aeración mecánica, como se muestra en la Figura 24. Transcurridos los 5 días de tratamiento, se determinaron los parámetros DBO_5 y DQO, así como los otros tres parámetros de seguimiento (pH, conductividad eléctrica y temperatura); ello permitió evaluar el efecto producido por *Pseudomonas putida* ATCC 49128 sobre los parámetros en estudio (Morillo y Guevara, 2014).



Figura 24. Unidades experimentales dispuestas de manera aleatoria.

2.1.4. Tratamientos

La presente investigación dispuso de tres tratamientos (T1, T2 y T3), más un tratamiento control o testigo T0 denotados en la Tabla 6; cada tratamientos se trabajó por triplicado y su diseño implicó una misma cuantía volumétrica de muestra a depurar y una misma proporción de espumas de poliuretano como matriz de inmovilización; en ese sentido, la única fuente de variación fueron las distintas concentraciones de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 dispuestas en cada tratamiento; es así que en el T1 se agregó 1 ml de medio líquido, lo cual permitió obtener una concentración de 1×10^8 UFC/ml; mientras que en T2 se agregó 1,5 ml y en T3 fueron

adicionados 2 ml, propiciando una concentraciones de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml y 2×10^8 UFC/ml respectivamente. Cabe mencionar que, a diferencia de los tratamientos anteriormente descritos, en el tratamiento control T0 se reemplazó el agua muestra por agua destilada estéril, a la vez que la concentración bacteriana inoculada en el medio líquido, fue de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

Tabla 6

Descripción de los tratamientos experimentales

Tratamiento*	Descripción
T0 (control)	AD + EP + <i>Pseudomonas putida</i> $1,5 \times 10^8$ UFC/ml
T1	AE + EP + <i>Pseudomonas putida</i> $1,0 \times 10^8$ UFC/ml
T2	AE + EP + <i>Pseudomonas putida</i> $1,5 \times 10^8$ UFC/ml
T3	AE + EP + <i>Pseudomonas putida</i> $2,0 \times 10^8$ UFC/ml

Fuente: Elaboración propia, a partir de (Chitiva y Dussán, 2003; Morillo y Guevara, 2014).

*: AE: 150 ml de agua residual efluente; EP: 1 g de espuma de poliuretano cortada en cubos de 5 mm de lado; AD: agua destilada.

2.1.5. Unidades experimentales

Las unidades de experimentación fueron 12 matraces Erlenmeyer de 250 ml; por un lado, 9 matraces contuvieron 150 ml de agua residual efluente, 1 g de espumas de poliuretano cortadas en cubos de 5 mm de lado y diferentes concentraciones de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en UFC/ml; por otro lado, cada uno de los 3 matraces restantes albergaron 150 ml de agua destilada, 1 g de espumas de poliuretano cortado en las proporciones anteriormente descritas y una determinada concentración de células bacterianas viables (Morillo y Guevara, 2014).

Cabe indicar que el experimento se desarrolló en condiciones aerobias; no obstante, el orificio de entrada de los matraces Erlenmeyer fueron cubiertos por capuchones de algodón blanco para evitar algún tipo de contaminación; adicionalmente, cada una de las unidades experimentales se sometieron a las mismas condiciones ambientales y de temperatura constante (30 °C). Como se

muestra en la Figura 25, la disposición de los tratamientos en las unidades experimentales se realizó de manera aleatoria, atendiendo los lineamientos del Diseño Completamente al Azar (DCA).

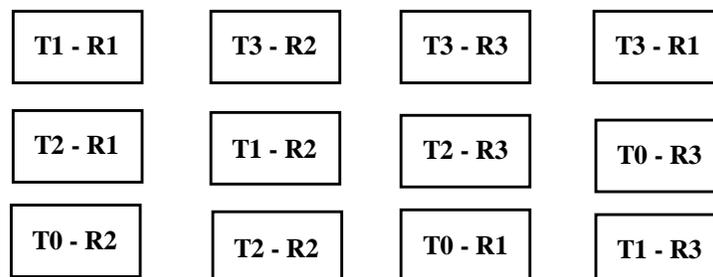


Figura 25. Disposición aleatoria de las unidades experimentales.

2.1.6. Identificación de variables y su mensuración

Las variables en estudio se evaluaron tomando como base al efecto producido por las distintas concentraciones de *Pseudomonas putida* ATCC 49128® aplicadas, y la variación de los parámetros señalados en la Tabla 7.

Tabla 7

Variables y su mensuración

Variable	Mensuración *	Unidad de medida
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128	Dilución y siembra en placa	UFC/ml
DBO ₅	Electrodo de membrana	mg/L
DQO	Método Colorimétrico	mg/L
pH	Método electrométrico	Intervalo de pH
Temperatura	Método tradicional	°C
Conductividad eléctrica	Electrométrico en agua	μS/cm

Fuente: Elaboración propia, a partir de APHA *et al.* (1992).

*: La mensuración de cada una de las variables se detalla en el apartado 2.1.3. Inciso b) Etapa de laboratorio.

2.1.7. Diseño estadístico del experimento

El presente estudio fue desarrollado bajo un diseño completamente al azar (DCA), el cual contempló una única fuente de variación (distintas concentraciones de *Pseudomonas putida* ATCC 49128), ello permitió comparar los tratamientos de manera efectiva, dada las condiciones controladas bajo las cuales se desarrolló el experimento. En tal sentido, el DCA se estructura según el Modelo Aditivo Lineal (MAL), el cual, además de tener en cuenta una única fuente de variación conocida, considera el efecto y el error experimental, tal como lo señala (Di Rienzo *et al.*, 2005).

$$Y_i = \mu + t_i + e_i$$

Donde:

Y_i = Observación del i -ésimo tratamiento

μ = Parámetro, efecto medio

t_i = Efecto del tratamiento i

e_i = Discrepancia o error experimental en el tratamiento i

2.1.8. Análisis estadístico de datos

Con la consigna de desarrollar un correcto tratamiento y análisis estadístico de la información recabada, se recurrió al programa SPSS v.25., como procedimiento inicial, se verificó la normalidad de los resultados mediante el test de Shapiro – Wilk, dado que el tamaño de la muestra fue inferior a cincuenta datos; también se evaluó la homogeneidad de las varianzas a través de la prueba de Levene. Tras ello, se verificó el posible efecto producido por los tratamientos, sobre cada parámetro en estudio, por medio del análisis de varianza de un factor (ANOVA); más aún, la prueba de Tukey permitió comparar entre sí, las medias de cada tratamiento. Cabe precisar que las pruebas efectuadas se trabajaron a un 5 % de significancia ($\alpha = 0,05$).

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en condiciones de laboratorio

El crecimiento de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 fue determinado cada 60 minutos, por un lapso de 11 horas ininterrumpidas. Para ello, se inoculó una asada de la cepa bacteriana en 150 ml de caldo tripticasa de soya (hora cero) y se puso en incubación a 30 °C; pasada la primera hora, se dio inicio a las mediciones por espectrofotometría y por dilución y siembra en placa, los resultados se muestran en la Figura 26.

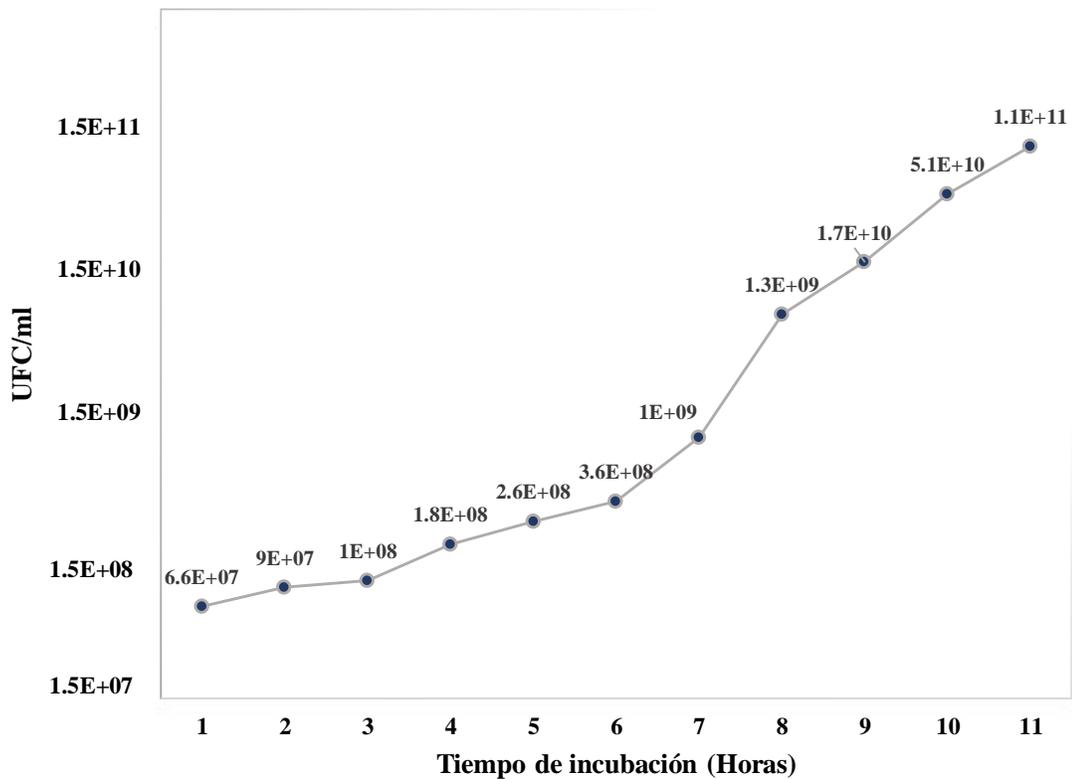


Figura 26. Perfil cinético de crecimiento de *Pseudomonas putida* ATCC 49128, cuantificado por medio del método de dilución sucesiva y siembra en placa.

Con las concentraciones bacterianas determinadas durante 11 horas consecutivas en UFC/ml, se calcularon los parámetros cinéticos que caracterizan el crecimiento de la cepa; dichos parámetros fueron propuestos por Sánchez (2018), los resultados se exponen en la Tabla 8.

Tabla 8

Parámetros cinéticos de crecimiento de Pseudomonas putida calculados en el presente estudio

Parámetro		Resultado
Tasa máxima de crecimiento	μ (horas ⁻¹)	0,35
Tiempo de duplicación	t_d (horas)	1,98
Capacidad de carga	k (UFC.ml ⁻¹)	10,91 x 10 ¹⁰

Fuente: Elaboración propia, a partir de Sánchez (2018).

3.2. Características fisicoquímicas de los efluentes de la PTAR Collique, en contraste con los LMP para efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales

Las características fisicoquímicas de los efluentes al momento del muestreo, se verificaron en base a cinco (5) parámetros mostrados en la Tabla 9; tres de los cuales fueron determinados en campo (pH, temperatura y conductividad eléctrica) y dos en laboratorio (DBO₅ y DQO).

Tabla 9

Características fisicoquímicas iniciales del agua residual efluente de la PTAR Collique

Parámetro	Unidad	Resultado
DBO ₅	mg/L	61,58 ± 0,675
DQO	mg/L	91,00 ± 0,200
pH	Unidad de pH	7,3 ± 0,00
Temperatura	°C	22,8 ± 0,10
Conductividad eléctrica	μS/cm	1210 ± 0,00

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados indican que la DBO₅ fue de $61,58 \pm 0,675$ mg/L, mientras que la DQO se encontró en un nivel medio de 91,00 mg/L con un desvío típico de $\pm 0,200$; además, los valores de pH, conductividad eléctrica y temperatura fueron de 7,3; 1210 μ S/cm y $22,8 \pm 0,1$ °C, respectivamente; ello se ilustra en la Figura 27.

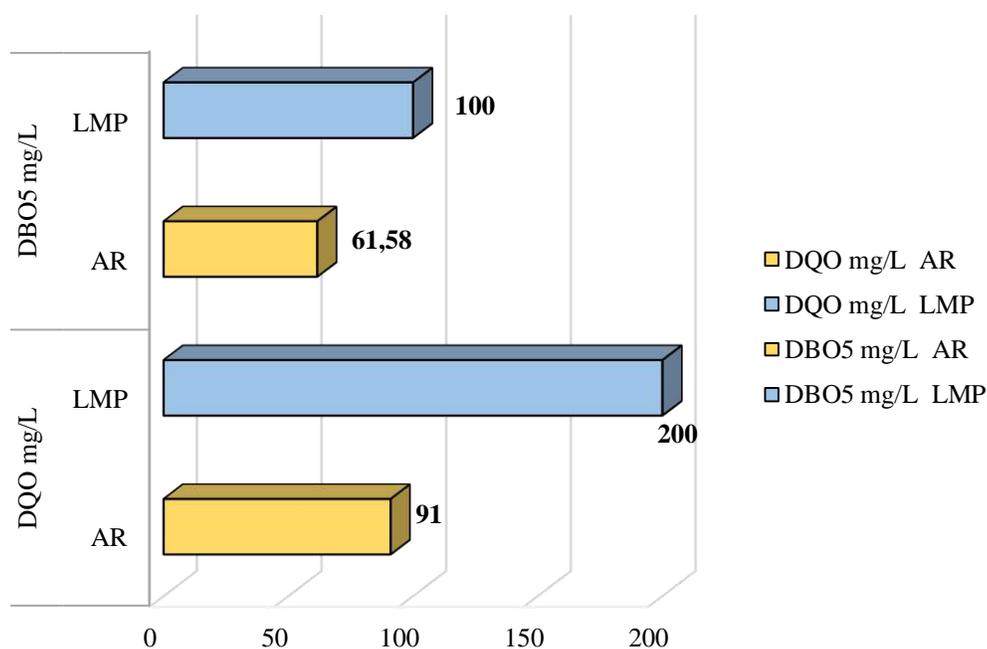


Figura 27. Contraste entre los resultados de DBO₅ y DQO de los efluentes de la PTAR Collique (AR) y los valores establecidos en los LMP para efluentes de PTAR (Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM).

Por otro lado, el valor de pH determinado en los efluentes de la PTAR Collique, fue de 7,3 unidades de pH. Mientras que para el parámetro temperatura, las muestras de agua de la PTAR Collique presentaron un valor 22,8 °C, en campo. En ese sentido, dichos resultados son mostrados junto a los valores establecidos en los LMP para este tipo de efluentes y se representan en la Figura 28.

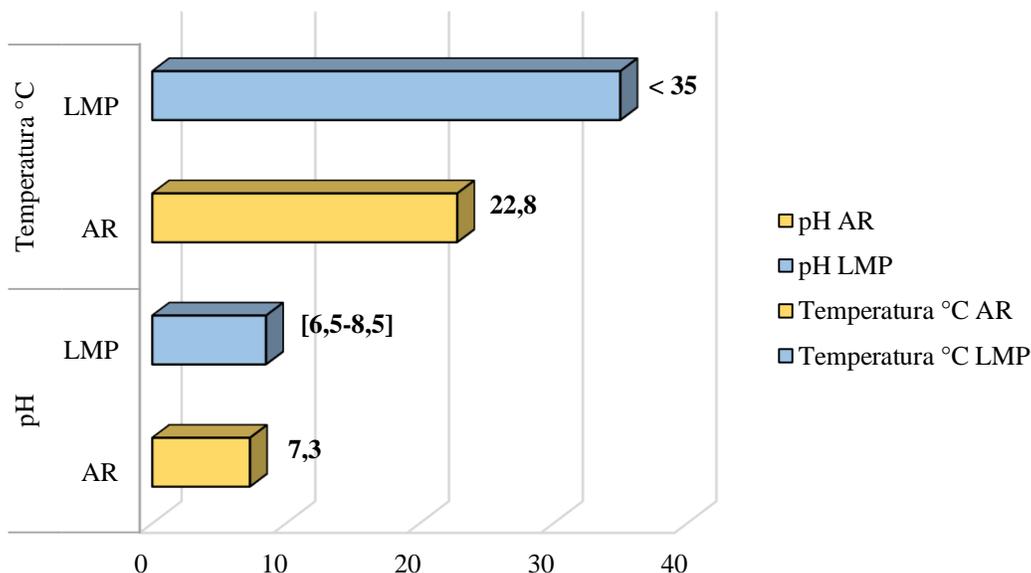


Figura 28. Contraste entre los resultados de pH y temperatura de los efluentes de la PTAR Collique (AR) y los valores establecidos en los LMP para efluentes de PTAR (Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM).

3.3. Variación de la demanda bioquímica de oxígeno de los efluentes de la PTAR Collique por efecto de *Pseudomonas putida* ATCC 49128® inmovilizadas en espumas de poliuretano

Las muestras de efluente, provenientes de la PTAR Collique, fueron sometidas a tres tratamientos durante 5 días; cada tratamiento fue inoculado con diferentes volúmenes de medio líquido, el cual albergó una concentración conocida de *Pseudomonas putida* ATCC 49128. La Figura 29, permite observar los resultados de los valores de DBO₅ al momento de la toma de muestras e inicio del experimento (día 1), y la variación de dicho parámetro al final del experimento (día 5), por cada tratamiento.

En ese sentido, todos los tratamientos muestran una reducción en los valores de la DBO₅, siendo T1 el tratamiento en el cual se produce la mayor variación, pasando de $61,58 \pm 0,675$ mg/L a $27,84 \pm 0,761$ mg/L de DBO₅ en promedio, lo cual supone una reducción del 54,8 %; por otro lado, el tratamiento T3 sufrió la menor variación, dado que la DBO₅ al final del experimento

fue de $34,88 \pm 0,793$ en promedio, por lo que alcanzó una reducción del 43,4 %, respecto al valor de la DBO₅ inicial (Tabla 10).

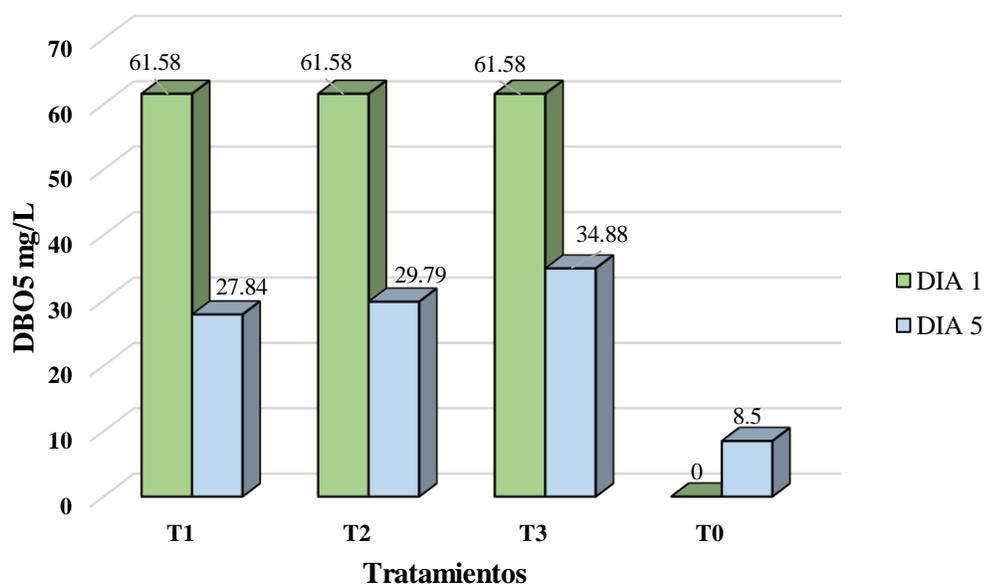


Figura 29. Variación de los valores de DBO₅ en mg/L al inicio y final del experimento.

Tabla 10

Resultados de los valores promedio y desviación estándar ($\pm DS$) de la DBO₅ en mg/L al inicio (día 1) y al final (día 5) del experimento

Tratamientos	Tiempo (Días)	
	Día 1	Día 5
T1	$61,58 \pm 0,675$	27,47
	$61,58 \pm 0,675$	28,71
	$61,58 \pm 0,675$	27,33
Promedio	$61,58 \pm 0,675$	$27,84 \pm 0,761$
T2	$61,58 \pm 0,675$	30,75
	$61,58 \pm 0,675$	29,06
	$61,58 \pm 0,675$	29,56
Promedio	$61,58 \pm 0,675$	$29,79 \pm 0,871$
T3	$61,58 \pm 0,675$	35,13
	$61,58 \pm 0,675$	35,53
	$61,58 \pm 0,675$	34,00
Promedio	$61,58 \pm 0,675$	$34,88 \pm 0,793$
T0 (control)	0,00	8,82
	0,00	8,28
	0,00	8,40
Promedio	0,00	$8,50 \pm 0,282$

Fuente: Elaboración propia.

La normalidad de los datos y uniformidad de las varianzas fueron verificadas mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente; tal como se muestra en el Apéndice 1. Además, se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor, mostrado en el Apéndice 2, el mismo que permitió observar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (diferentes concentraciones iniciales de células de *Pseudomonas putida*) respecto a la variación de los valores de DBO₅ ($p = 0,000$). Adicionalmente, los valores medios de DBO₅ en cada tratamiento, fueron comparados por medio de la prueba de Tukey a un 5 % de significancia ($\alpha = 0,05$); encontrándose que cada una de las medias de los tratamientos (T1, T2, T3 y T0) presentan significativas diferencias entre sí, siendo T1 y T2 los tratamientos que presentaron valores medios de DBO₅ más bajos, frente al valor inicial ($27,84 \pm 0,761$ mg/L y $29,79 \pm 0,871$) respectivamente, evidenciando una mayor efectividad en la reducción del parámetro. Por otro lado, a diferencia de los demás tratamientos que redujeron los niveles de DBO₅, el tratamiento control T0 mostro un incremento de este en $8,50 \pm 0,282$ mg/L.

- **Remoción porcentual de la DBO₅ en cada tratamiento**

En lo que respecta a los porcentajes de reducción de la DBO₅, el diagrama de cajas mostrado en la Figura 30, indica una distribución diferenciada entre la remoción porcentual de DBO₅ alcanzados por T1 y T2, el cual asciende a $54,79 \pm 1,23$ y $51,62 \pm 1,41$ % respectivamente; más aun, la diferenciación es más marcada respecto a T3, tratamiento que alcanzó una remoción de solo $43,35 \pm 1,29$ %.

Además, es factible apreciar que la variabilidad de la DBO₅ es menor en T1 y T2 a medida que se alcanza un nivel de remoción mayor; por el contrario, T3 muestra una menor variabilidad de datos a medida que la remoción porcentual es menor. Finalmente, como se denota en la Figura 30, ningún tratamiento reporta valores atípicos ni extremos.

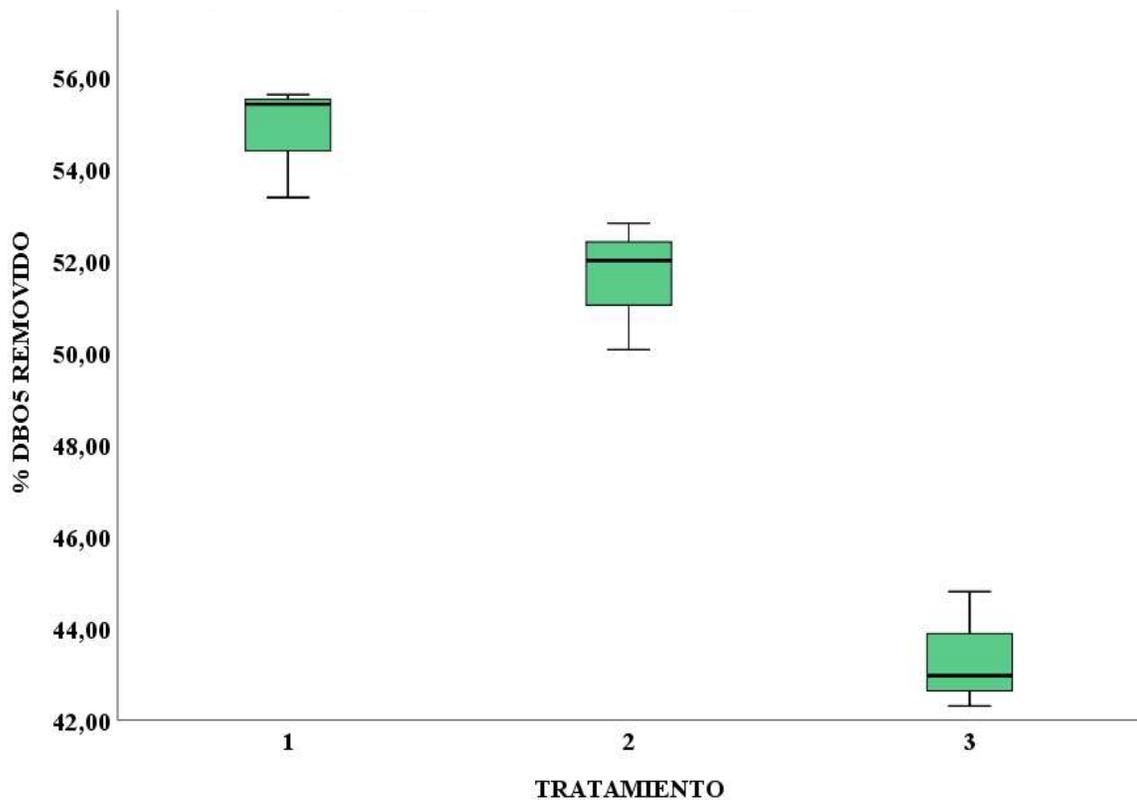


Figura 30. Reducción porcentual de la DBO₅ alcanzado por cada tratamiento tras el experimento.

Continuando con el análisis estadístico respecto a la remoción porcentual de DBO₅ alcanzado tras el ensayo experimental, se tiene que los tratamientos T1 y T2 lograron una mayor reducción de la DBO₅ con valores promedio de $54,79 \pm 1,23$ % y $51,62 \pm 1,41$ % respectivamente; mientras que T3 solo alcanzó una reducción del $43,35 \pm 1,29$ %, a pesar de que fue el tratamiento que albergó el mayor número de células bacterianas de *Pseudomonas putida* ATCC 49128®. Al analizar las varianzas, se constataron diferencias entre los porcentajes de reducción de DBO₅ alcanzados por cada tratamiento a un nivel significativo ($p < 0,05$); en tanto, el test de Tukey agrupa a los porcentajes medios de reducción alcanzados por los tratamientos T1 y T2, por lo que estadísticamente son iguales; no así a la media porcentual de reducción de DBO₅ alcanzado por T3 y los demás tratamientos, evidenciando clara diferencia estadística, tal como se muestra en el Apéndice 5.

3.4. Efectos sobre la DQO, pH, conductividad eléctrica y temperatura, de los efluentes de la PTAR Collique, por influencia de *Pseudomonas putida* ATCC 49128® inmovilizadas en espumas de poliuretano

a) Demanda química de oxígeno (DQO)

En principio, los efluentes de la PTAR Collique presentaron un nivel promedio de $91,00 \pm 0,200$ mg/L de DQO. Tras el ensayo, los valores de DQO experimentaron una reducción en todos los tratamientos a excepción del tratamiento control T0, en el cual se produjo un aumento en los niveles de DQO respecto al valor inicial de cero. En contraste, los tratamientos que alcanzaron una mayor reducción en los niveles de DQO fueron T1 y T2, quienes pasaron de albergar $91,00 \pm 0,200$ mg/L de DQO en el primer día de tratamiento, a contener niveles de $43,37 \pm 0,568$ mg/L y $45,90 \pm 0,360$ mg/L de DQO el término del experimento, respectivamente. Por otro lado, el T3 fue el tratamiento que experimentó la menor reducción en los valores de DQO pasando de $91,00 \pm 0,200$ mg/L en el primer día de tratamiento a $53,00 \pm 0,300$ mg/L en el día cinco, ello supuso solo una reducción del 41,7 % de la DQO. Las variaciones de los niveles de DQO alcanzados por cada tratamiento se muestran en la Figura 31.

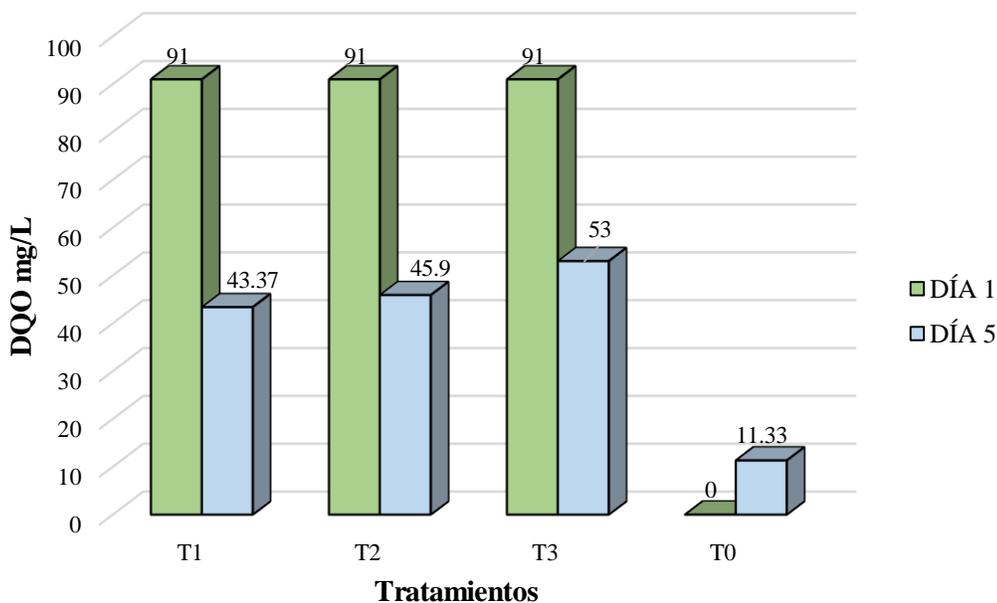


Figura 31. Niveles promedio de la DQO en mg/L, al inicio y final del experimento.

La prueba de Shapiro-Wilk indica que los niveles de DQO mostrados en la Tabla 11, presentan una distribución normal ($p > 0,05$); más aún, los resultados del test de Levene con un ($p = 0,574 > \alpha = 0,05$), evidencia un cumplimiento satisfactorio del supuesto “varianzas son homogéneas”, tal como se indica en el Apéndice 6. En ese sentido, al analizar los resultados de ANOVA se tiene que, los niveles de DQO reducidos, por efecto de los tratamientos, presentan diferencias estadísticas significativas entre sí ($p < 0,05$). Así mismo, al comparar los valores medios de reducción de DQO por cada tratamiento, haciendo uso de la prueba de Tukey al 5 % de significancia, mostrado en el Apéndice 8, se concluye que dichas medias son distintas entre sí y que por tanto no hay similitud estadística entre ellos; siendo T1 el tratamiento con menor valor promedio de DQO al final del ensayo $43,37 \pm 0,568$ mg/L, y, en consecuencia, el tratamiento que logró una mayor efectividad a la hora de reducir la DQO.

Tabla 11

Resultados de los valores promedio y desviación estándar ($\pm DS$) de la DQO en mg/L al inicio (día 1) y al final (día 5) del experimento

Tratamientos	Tiempo (Días)	
	Día 1	Día 5
T1	91,00 \pm 0,200	44,00
	91,00 \pm 0,200	43,20
	91,00 \pm 0,200	42,90
Promedio	91,00 \pm 0,200	43,37 \pm 0,568
T2	91,00 \pm 0,200	45,60
	91,00 \pm 0,200	45,80
	91,00 \pm 0,200	46,30
Promedio	91,00 \pm 0,200	45,90 \pm 0,360
T3	91,00 \pm 0,200	52,70
	91,00 \pm 0,200	53,00
	91,00 \pm 0,200	53,30
Promedio	91,00 \pm 0,200	53,00 \pm 0,300
T0 (control)	0,00	11,40
	0,00	11,70
	0,00	10,90
Promedio	0,00	11,33 \pm 0,403

Fuente: Elaboración propia.

- **Remoción porcentual de la DQO en cada tratamiento**

Los porcentajes de remoción de la DQO alcanzados por cada tratamiento, indican una notable diferenciación entre sí, como lo expone el diagrama de cajas de la Figura 32; T1 y T2 alcanzaron mayores niveles de remoción porcentual, mientras que T3 fue el tratamiento que logró remover la menor cantidad de DQO. Además, en todos los tratamientos se observa muy poca variación de datos respecto a la mediana, sin presentar valores atípicos ni extremos.

Así, la Figura 32 muestra la reducción de la DQO resultante, expresado en valores porcentuales (%), sugieren que T1 alcanzó la mayor reducción de la DQO con $52,34 \pm 0,62$ % al final del tratamiento (día 5), mientras que los tratamientos T2 y T3 lograron una reducción del $49,56 \pm 0,39$ % y $41,75 \pm 0,33$ % respectivamente. Los porcentajes de remoción de DQO alcanzados presentan diferencias estadísticas significativas, en por lo menos uno de los tratamientos, según el análisis de varianza mostrado en el Apéndice 9. Complementariamente, la prueba de Tukey al 5 % de significancia, revela que la media de los porcentajes de DQO removidos en cada uno de los tratamientos, presentan diferencias significativas entre sí y, por tanto, cada tratamiento surtió un efecto diferenciado en la disminución de las concentraciones medias de DQO, siendo T1 el más efectivo.

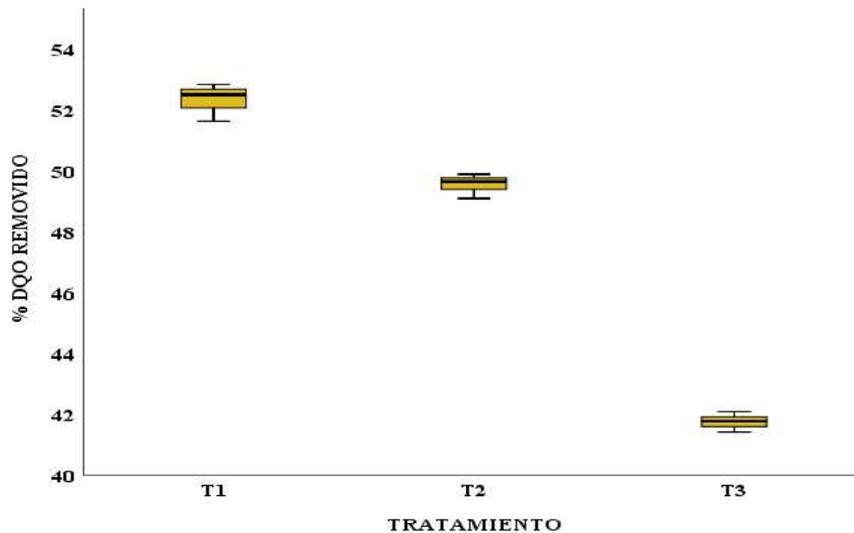


Figura 32. Reducción porcentual de la DQO alcanzado por cada tratamiento tras el experimento.

b) pH

Los resultados del análisis de pH, determinados diariamente durante los cinco días que duró el experimento, muestran que los niveles del potencial de hidrogeno en los tratamientos (T1, T2 y T3) fluctuó entre $7,46 \pm 0,057$ y $8,23 \pm 0,057$ en promedio; mientras que los valores de pH en el tratamiento control (T0) se movieron entre $6,60 \pm 0,100$ y $7,33 \pm 0,057$ en promedio. Todos los tratamientos presentaron el menor valor de pH al inicio del ensayo (día 1), y mantuvieron un incremento constante hasta alcanzar su máximo valor de pH en el día 4; asimismo, todos los tratamientos experimentan una caída en sus niveles de pH hacia el final del ensayo (día 5), tal como se observa en la Figura 33.

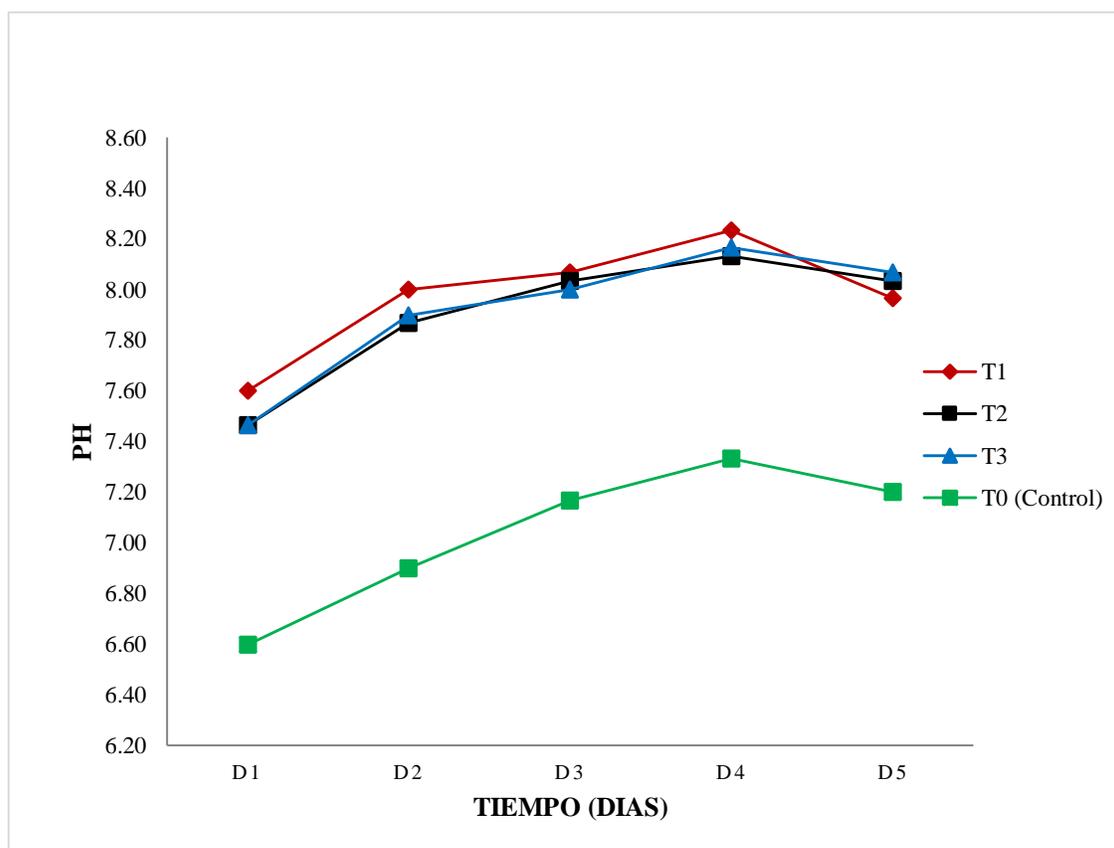


Figura 33. Niveles promedio de pH en las muestras de cada tratamiento, medidos diariamente durante el experimento.

La prueba de Shapiro-Wilk indica que los datos de pH mostrados en la Tabla 12, presentan una distribución normal con un (p valor > 0,05); además, con un (p valor = 0,707 > α = 0,05) se cumplió con el supuesto de que las varianzas son homogéneas, tras aplicar la prueba de Levene detallado en el Apéndice 11. En ese sentido, los resultados obtenidos por el ANOVA sugieren discrepancias estadísticas de nivel significativo en los valores de pH de al menos uno de los tratamientos. Por lo que, al analizar los resultados valiéndose del test de Tukey a un 95 % de confiabilidad, se tiene que; los niveles medios del tratamiento control T0 divergen estadísticamente de los promedios de pH alcanzados por T1, T2 y T3; además, estos últimos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí, tal como se muestra en el Apéndice 13. En base a lo señalado, es posible afirmar que los niveles de pH presentes en T0 son los más bajos y más cercanos a la neutralidad a diferencia de los demás tratamientos, que presentan valores de pH estadísticamente iguales y siempre por encima de 7.

Tabla 12

Resultados de los niveles promedio y desviación estándar (\pm DS) de pH determinados de manera diaria, durante los cinco días que duró el experimento

Tratamientos	Tiempo (Días)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
T1	7,5	7,9	8,0	8,2	7,9
	7,6	8,0	8,2	8,2	8,0
	7,7	8,1	8,0	8,3	8,0
Promedio	7,60 \pm 0,100	8,00 \pm 0,100	8,07 \pm 0,115	8,23 \pm 0,057	7,97 \pm 0,057
T2	7,5	7,9	8,1	8,2	8,1
	7,4	7,9	8,1	8,1	8,0
	7,5	7,8	7,9	8,1	8,0
Promedio	7,46 \pm 0,057	7,86 \pm 0,057	8,03 \pm 0,115	8,13 \pm 0,057	8,03 \pm 0,057
T3	7,5	7,9	8,0	8,2	8,1
	7,5	8,0	8,1	8,2	8,1
	7,4	7,8	7,9	8,1	8,0
Promedio	7,47 \pm 0,057	7,90 \pm 0,100	8,00 \pm 0,100	8,17 \pm 0,057	8,07 \pm 0,057
T0 (control)	6,7	6,9	7,2	7,4	7,3
	6,5	6,9	7,1	7,3	7,2
	6,6	6,9	7,2	7,3	7,1
Promedio	6,60 \pm 0,100	6,90 \pm 0,00	7,17 \pm 0,057	7,33 \pm 0,057	7,20 \pm 0,100

Fuente: Elaboración propia.

c) Temperatura

Los resultados de los valores promedio de temperatura determinados diariamente durante los cinco días que duró el ensayo, mostrados en la Tabla 13, fluctuaron entre $25,36 \pm 0,115$ °C, siendo el valor más bajo el correspondiente al tratamiento control T0 en el último día de medición y $27,47 \pm 0,115$ °C, el valor más alto registrado en T2 durante el primer día de medición. Todos los tratamientos, incluyendo el tratamiento control (T0), muestran una tendencia a la baja en los valores de temperatura entre el inicio (día 1) y el final del experimento (día 5); a excepción de dos de los tratamientos que muestran un ligero incremento en sus valores de temperatura, tal es el caso de T2 que pasa de $26,87 \pm 0,057$ °C en promedio durante el día dos, a $26,90 \pm 0,100$ °C al día tres; así mismo, se registran incrementos de temperatura en T3, los cuales van de $26,73 \pm 0,057$ °C en el día dos a $26,83 \pm 0,115$ °C durante el día 3 y luego a $26,93 \pm 0,152$ al día cuatro del ensayo, tal como se ilustra en la Figura 34.

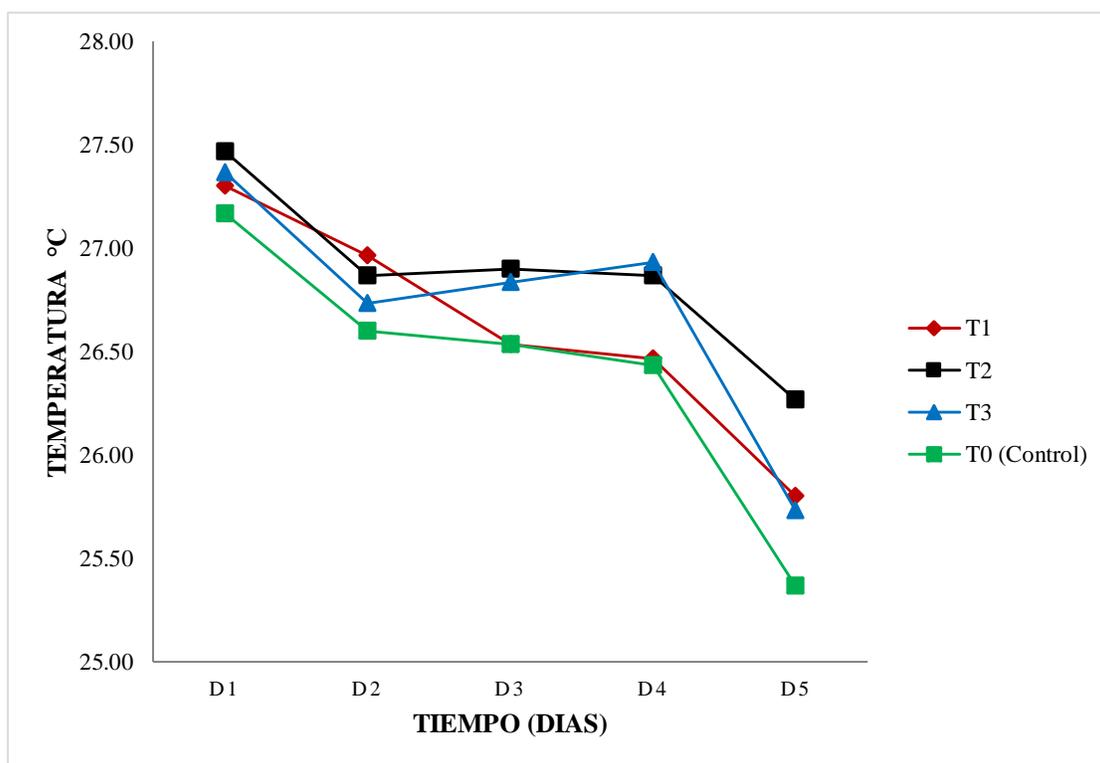


Figura 34. Niveles promedio de Temperatura (°C) en cada tratamiento, medidos de manera diaria durante el experimento.

El ANOVA de una vía aplicado, determina el valor de ($p = 0,149 > \alpha = 0,05$), indicando la igualdad estadística de manera significativa entre los valores promedios de temperatura de los tratamientos, Apéndice 15. Más aún, la prueba de Tukey aplicada a un nivel de confiabilidad del 95 %, agrupa a los valores medios de temperatura de todos los tratamientos en un mismo subgrupo, lo cual implica que; si bien a simple vista se observan ciertas diferencias entre los grados de temperatura promedio de T1, T2, T3 y T0 (Tabla 13); estadísticamente, dichos valores son iguales. En ese sentido, vale decir, que los tratamientos aplicados no influyeron en la variación de la temperatura del medio experimental, toda vez que dicho parámetro fue controlado a un nivel ambiental constante de 30 °C, para lo cual se usó una estufa.

Tabla 13

Resultados de los grados promedio y desviación estándar ($\pm DS$) de la temperatura (°C), medidos diariamente, durante el experimento

Tratamientos	Tiempo (Días)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
T1	27,4	27,0	26,3	26,1	25,5
	27,2	27,0	26,8	26,7	26,0
	27,3	26,9	26,5	26,6	25,9
Promedio	27,30 \pm 0,100	26,97 \pm 0,057	26,53 \pm 0,251	26,47 \pm 0,321	25,80 \pm 0,264
T2	27,4	26,9	27,0	27,0	26,3
	27,6	26,8	26,9	26,7	26,1
	27,4	26,9	26,8	26,9	26,4
Promedio	27,47 \pm 0,115	26,87 \pm 0,057	26,90 \pm 0,100	26,87 \pm 0,152	26,26 \pm 0,152
T3	27,5	26,7	26,9	26,9	25,8
	27,3	26,8	26,7	27,1	25,7
	27,3	26,7	26,9	26,8	25,7
Promedio	27,37 \pm 0,115	26,73 \pm 0,057	26,83 \pm 0,115	26,93 \pm 0,152	25,73 \pm 0,057
T0 (control)	26,9	26,6	26,5	26,6	25,3
	27,2	26,7	26,6	26,4	25,5
	27,4	26,5	26,5	26,3	25,3
Promedio	27,17 \pm 0,251	26,60 \pm 0,100	26,53 \pm 0,057	26,43 \pm 0,152	25,36 \pm 0,115

Fuente: Elaboración propia.

d) Conductividad eléctrica

Los resultados del parámetro conductividad eléctrica, muestran una fluctuación muy marcada de los tratamientos T1, T2 y T3 con valores que están entre $1306,66 \pm 28,86 \mu\text{S}/\text{cm}$ como valor mínimo, correspondiente al tratamiento T1 en el día cinco de medición y $1503,33 \pm 5,77 \mu\text{S}/\text{cm}$

como valor máximo, para al primer día de medición del tratamiento T3. Además, en la Figura 35 se observa una variación similar entre los tratamientos T2 y T3, dado que ambos experimentan una reducción en los niveles de conductividad eléctrica, pasando de $1446,67 \pm 15,27 \mu\text{S/cm}$ y $1503,33 \pm 5,77 \mu\text{S/cm}$ en el día uno, a $1390,00 \pm 40,00 \mu\text{S/cm}$ y $1386,66 \pm 65,06 \mu\text{S/cm}$ en el día dos, respectivamente; del mismo modo se observa un incremento constante para ambos tratamientos hacia los días tres y cuatro del ensayo, y finalmente una caída hacia el final del experimento. Entre tanto, el tratamiento T1 muestra un incremento constante en sus niveles de conductividad eléctrica que van de $1346,66 \pm 20,81 \mu\text{S/cm}$ en el día uno, a $1396,66 \pm 47,25 \mu\text{S/cm}$ en el cuarto día de tratamiento, con una única reducción del parámetro hacia el final del ensayo (día 5). Por otro lado, el tratamiento T0 (control) muestra un incremento constante de los niveles de conductividad eléctrica de inicio a fin del ensayo, con valores que van desde $240,00 \pm 10,00 \mu\text{S/cm}$ a $320,00 \pm 10,00 \mu\text{S/cm}$.

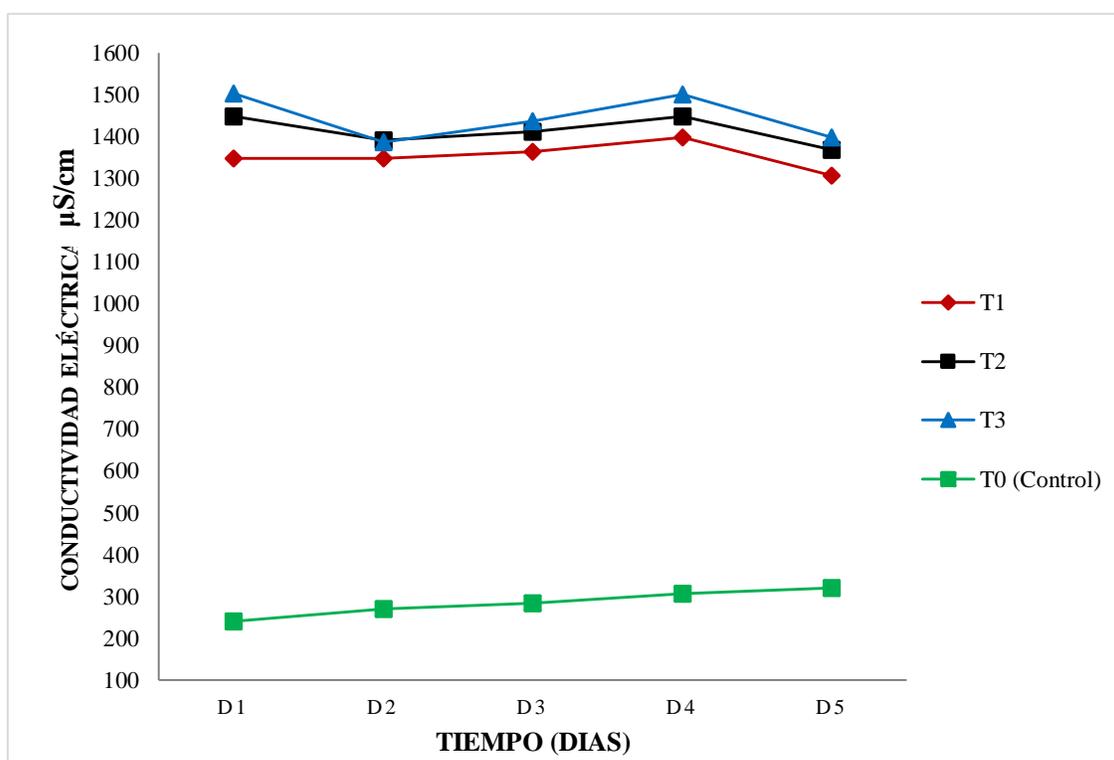


Figura 35. Niveles promedio de conductividad eléctrica ($\mu\text{S/cm}$) en cada tratamiento, medidos diariamente durante el experimento.

La normalidad de los datos de conductividad eléctrica mostrados en la Tabla 14, fue corroborada mediante la prueba de Shapiro-Wilk (p valor $> 0,05$). No obstante, la prueba de Levene detallado

en el Apéndice 17, indica que hay una baja homogeneidad en las varianzas de los tratamientos para el parámetro conductividad eléctrica (p valor = $0,043 < \alpha = 0,05$). Por otro lado, los resultados del ANOVA a un 95 % de confiabilidad, sugiere que hay significativa disparidad entre los niveles promedio de conductividad eléctrica de por lo menos uno de los tratamientos ($p < 0,05$). Por lo que, la prueba de Tukey, detallada en el Apéndice 19, contribuyó a esclarecer dichas diferencias; evidenciando una asociación significativa entre los tratamientos T2 y T3 con valores promedio de conductividad eléctrica más elevados que los demás tratamientos; entre tanto, los tratamientos T1 y T0 son mostrados en subgrupos independientes, por lo que tendrían diferencias estadísticas significativas entre sí y con los otros dos tratamientos; siendo T0 el tratamiento con los niveles de conductividad eléctrica más bajos. Finalmente, teniendo en cuenta los niveles de CE al inicio y al final de tratamiento, se tiene que; los tratamientos T2 y T3 experimentaron una reducción del 9,09 % de CE en promedio, el tratamiento T1 sufrió una reducción de 2,97 %; por el contrario, el tratamiento T0 mostró un incremento en los niveles de conductividad eléctrica del 25 % al final del experimento.

Tabla 14

Resultados de los valores promedio y desviación estándar ($\pm DS$) de la conductividad eléctrica ($\mu S/cm$), medidos diariamente, durante el experimento

Tratamientos	Tiempo (Días)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
T1	1340	1360	1390	1450	1340
	1370	1340	1350	1380	1290
	1330	1340	1350	1360	1290
Promedio	1346,66\pm20,81	1346,67\pm11,55	1363,33\pm23,09	1396,66\pm47,25	1306,66\pm28,86
T2	1430	1390	1400	1430	1340
	1460	1430	1440	1470	1360
	1450	1350	1390	1440	1400
Promedio	1446,67\pm15,27	1390,00\pm40,00	1410,00\pm26,45	1446,66\pm20,81	1366,66\pm30,55
T3	1510	1320	1410	1520	1410
	1500	1450	1460	1480	1400
	1500	1390	1440	1500	1380
Promedio	1503,33\pm5,77	1386,66\pm65,06	1436,66\pm25,16	1500,00\pm20,00	1396,66\pm15,27
T0 (control)	250	280	300	320	320
	230	270	280	310	310
	240	260	270	290	330
Promedio	240,00\pm10,00	270,00\pm10,00	283,33\pm15,27	306,66\pm15,27	320,00\pm10,00

Fuente: Elaboración propia

CAPÍTULO IV: DISCUSIONES

4.1. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en condiciones de laboratorio

En la presente investigación, la cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inoculada en medio líquido, alcanzó una concentración de 11×10^{10} UFC/ml a las 11 horas de crecimiento; con una tasa de variación positiva (μ) de $0,35 \text{ hora}^{-1}$, y una duplicación poblacional en 1,98 horas; lo cual supone un crecimiento superior al reportado en investigaciones como las de Anaya (2019) y Takahashi (2018), en las que utilizaron el mismo medio de cultivo líquido y condiciones de laboratorio (aerobiosis, temperatura controlada y conteo bacteriano con frecuencia horaria); dichos investigadores reportan una concentración de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 de 33×10^7 UFC/ml y 14×10^7 UFC/ml respectivamente, a las 11 horas de crecimiento; no obstante, el estudio realizado por Takahashi implicó un periodo de adaptación a metales pesados, lo cual pudo retrasar el crecimiento bacteriano en las primeras 8 horas. En ese sentido, al analizar las posibles causas que dan pie a una diferenciación entre los parámetros cinéticos de crecimiento de *Pseudomonas putida* del presente estudio, respecto a otras investigaciones, se advierte que; durante la inoculación inicial de la cepa, se introdujo un número indeterminado de células bacterianas en el medio de cultivo líquido; toda vez que dicho procedimiento se fundamenta en el uso de un asa bacteriológica para el traslado de un grupo de bacterias previamente activadas en medio sólido, hacia el medio de cultivo líquido; en consecuencia, el número indeterminado de células bacterianas inoculadas, pudo dar cabida a la diferenciación en el crecimiento bacteriano.

Además, al comparar los parámetros cinéticos de crecimiento de *Pseudomonas putida* ATCC del presente estudio y de otras investigaciones abordadas por Takahashi (2018), Anaya (2019) y Quinteros (2018), mediante un análisis de varianza, se tiene que; existen diferencias

estadísticas significativas (p valor $< 0,05$) las cuales se detallan en el Apéndice 20. No obstante, los parámetros cinéticos de la presente investigación, aparecen dentro del espectro de valores de crecimiento reportados en otras investigaciones, lo cual denota una similitud en tendencia y velocidad de crecimiento óptimo de *Pseudomonas putida* ATCC, tal como se muestra en el Apéndice 25. Ante ello, resulta evidente que esta cepa bacteriana muestra un crecimiento exponencial diferenciado aún en condiciones ambientales y nutricionales similares. En este contexto, se concluye que el crecimiento mostrado por *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en la presente investigación es óptimo, dado la alta concentración bacteriana alcanzada en un lapso de tiempo corto (11×10^{10} UFC/ml a las 11 horas); además, de que los parámetros cinéticos de crecimiento calculados, aparecen dentro del rango de valores de crecimiento óptimos reportados en otras investigaciones.

4.2. Características fisicoquímicas de los efluentes de la PTAR Collique, en contraste con los LMP para efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales

El contraste entre los valores paramétricos determinados en los efluentes de la PTAR Collique, con la normativa ambiental vigente para este tipo de efluentes indica que; todos los parámetros cumplen con los niveles establecidos en los Límites Máximos Permisibles para Efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales (Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM). Así, el resultado de la concentración media de la DBO₅ fue de $61,58 \pm 0,67$ mg/L (38,42 % menos que el LMP), DQO de $91 \pm 0,20$ mg/L (54,5 % por debajo del nivel establecido en la norma), y un nivel de pH de 7,3 y temperatura de $22,8 \pm 0,10$ °C. En esa línea, Sánchez (2019), tras evaluar la calidad de los efluentes de PTAR, reporta similares resultados con valores de concentraciones inferiores a los LMP en un 52,4 % para la DBO₅ y 56 % para la DQO. En el otro extremo, SUNASS (2016) indica que al año 2013, de 252 PTAR evaluadas, el 21 % de estas incumplieron el parámetro DBO₅, mientras que 48 % de las 290 PTAR evaluadas presentaron incumplimientos de los LMP para el parámetro DQO. También, investigaciones como las de Montenegro (2016), y Cedrón y Cribilleros (2017) valoraron los efluentes de PTAR en cuanto a su calidad, reportando concentraciones de DQO superiores a lo establecido en la normativa en un 5 y 78 % respectivamente.

En este contexto, se hace evidente una variedad de casos en los cuales; por un lado, hay infraestructuras de tratamiento de aguas residuales deficientes y que no logran garantizar efluentes de calidad; mientras que, por otro lado, se tienen infraestructuras que realizan una adecuada depuración de las aguas servidas, como es el caso de la PTAR Collique. Teniendo en cuenta que el agua residual analizada en el presente estudio, es reutilizada para riego de áreas verdes en el distrito de Comas, tal como lo señala Carbonel (2020); y haciendo la salvedad de que se trata de agua residual efluente de PTAR y no de aguas en calidad de cuerpo receptor, cabe la posibilidad de comparar los resultados de conductividad eléctrica obtenidos, con lo establecido en la Categoría 3 de los ECA- agua (Aguas destinadas al riego de vegetales y bebida de animales), toda vez que dicha comparación ya fue realizada por Farfán (2015). En tal sentido, tanto el nivel de conductividad eléctrica inicial de las muestras de agua (1210 $\mu\text{S}/\text{cm}$), como los valores de conductividad eléctrica alcanzados tras el experimento (entre 1300 y 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$) se encuentran muy por debajo de lo establecido en la categoría 3 del ECA-agua (2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$). En tal sentido, se concluye que los efluentes de la PTAR Collique, presentan características fisicoquímicas acordes a la normativa ambiental vigente; por lo que, no supondrían riesgo alguno en lo social y ambiental según los parámetros DBO₅, DQO, pH, temperatura y conductividad eléctrica, evaluados en el presente estudio.

4.3. Variación de la demanda bioquímica de oxígeno y de la DQO de los efluentes de la PTAR Collique por efecto de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizadas en espumas de poliuretano

La bibliografía describe de manera amplia el uso de *Pseudomonas putida* en la depuración efectiva de diversos tipos de efluentes; estudios como los de Mansour *et al.* (2011), para tratar residuos líquidos generados en el trajín productivo de la elaboración de aceite de oliva; o investigaciones que buscan depurar efluentes generados durante el aprovechamiento de palma aceitera, llevada a cabo por Azoddein *et al.* (2015). Más aún, las células bacterianas de *P. putida* también han sido utilizadas para biorremediar desechos líquidos que albergan metales de alta densidad como el plomo, cromo o cadmio, obteniendo resultados muy favorables (Mayta y Vela, 2015; Takahashi, 2018). Sin embargo, no se conocen investigaciones que contemplen el uso de *Pseudomonas putida* para mejorar, de manera específica, la calidad de los efluentes de PTAR;

las cuales, en muchos casos suponen un peligro para la salud humana y para la perdurabilidad de los ecosistemas, dados los incumplimientos a los niveles umbrales de contaminación estipulados en la normativa ambiental (Montenegro, 2016). Pese a ello, tanto en la bibliografía mencionada, como en el presente trabajo, se evalúa el efecto producido por la cepa *Pseudomonas putida* como agente biorremediador, en base al grado de variación de parámetros fisicoquímicos como la DBO₅ o DQO; además, de tener en cuenta su influencia en los niveles de pH y conductividad eléctrica.

En ese sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio precisan que la cepa bacteriana *Pseudomonas putida* ATCC 49128 redujo la DBO₅ en un 54,79 % en promedio, y alcanzó una remoción máxima del 52,34 % de la DQO, los cuales suponen valores de remoción significativos ($p < 0,05$); ello se fundamenta en la flexibilidad metabólica de la cepa y la capacidad que posee para capturar iones y compuestos de carbono mediante polímeros estructurales y extracelulares (Marrero *et al.*, 2010). Del mismo modo, resultados reportados por Flórez (2016); el cual, tras aplicar *Pseudomonas putida* en la purificación de efluentes provenientes de una empresa dedicada a la producción de lácteos, muestran porcentajes de remoción de 87,45 % y 65,55 % para la DBO₅ y DQO, respectivamente. A su vez, Wang *et al.* (2008) utilizaron a la cepa bacteriana *Pseudomonas putida* para depurar muestras de agua provenientes de un Lago en China, obteniendo un nivel de remoción muy significativo ($p < 0,01$), con un promedio de 80,2 % de reducción de la DBO₅. Si bien, las investigaciones mencionadas alcanzan altos porcentajes de reducción de DBO₅ y DQO, resulta importante resaltar algunas diferencias metodológicas empleadas en dichas investigaciones respecto al presente estudio, lo cual podrían explicar las diferencias encontradas en los niveles de reducción de estos parámetros.

Es así que, los aspectos metodológicos más resaltantes en cada una de las investigaciones son; por un lado, Flórez (2016) introdujo aireación por burbujeo durante el tratamiento; mientras que Wang *et al.* (2008) desarrolló el experimento aplicando movimiento a 100 rpm; además, ambos trabajos se desarrollaron en un periodo de tiempo corto, 48 y 24 horas respectivamente. Ello guarda relación con la investigación de Mansour *et al.* (2011) quien al aplicar aireación y

agitación constante (200 rpm) en un ensayo para depurar efluentes líquidos originados durante la elaboración de aceite de oliva, utilizando *Pseudomonas putida*, logró disminuir la DBO₅ en un 92,5 % y la DQO en un nivel de 85,3 %, considerada estadísticamente muy significativa para el estudio ($p < 0,01$). Finalmente, se concluye que *Pseudomonas putida* ATCC 49128 es una bacteria con alto potencial biotecnológico, puesto que reduce significativamente ($p < 0,05$) la DBO₅ y DQO de aguas residuales efluentes de PTAR, con porcentajes de remoción de 54,79 % y 52,34 % respectivamente; además, cabe mencionar que la oxigenación y el movimiento aplicado en los procesos de biorremediación con esta cepa, contribuirían de manera sustancial a obtener rendimientos aún más satisfactorios respecto a la remoción de dichos parámetros.

Otro de los factores que favorecería el proceso de biorremediación por *Pseudomonas putida*, es la inmovilización bacteriana. Al respecto, Chitiva y Dusan (2003), indican que el uso de espumas de poliuretano (EPU) como medio de inmovilización, propicia el rápido crecimiento bacteriano, a tal punto de formar *biofilm* distinguible en el medio, y con ello hacer posible una mayor remoción de las cargas contaminantes del agua residual. En esa línea, el presente estudio acogió a las espumas de poliuretano (EPU) como medio de inmovilización pasiva; sin embargo, no fue posible aplicar microscopía de alta resolución que permita advertir alguna generación de *biofilm* sobre la matriz. No obstante, investigaciones como las de Botello *et al.* (2016) demuestran que la espuma de poliuretano (EPU) es uno de los polímeros con mayor capacidad de inmovilización bacteriana; permitiendo, además, una remoción de materia orgánica hasta en un 94 %. Ello coincide con lo reportado por Reyes *et al.* (2018) quienes evaluaron la inmovilización bacteriana en matrices orgánicas y sintéticas; obteniendo como resultado que la mayor cantidad de biomasa bacteriana inmovilizada se llevó a cabo por encapsulamiento en alginato de sodio y por adsorción en poliuretano liviano en forma de espuma, la cual propició la generación de 256,8 mg de biomasa bacteriana por g⁻¹ de matriz. Por lo que, teniendo en cuenta la significancia de los resultados alcanzados por el presente trabajo; se concluye que la inmovilización por adsorción en cubos de espumas de poliuretano, favorece el desarrollo y proliferación de *Pseudomonas putida* ATCC 49128, contribuyendo, además, a que los procesos de aprovechamiento de la DBO₅ y DQO sean más efectivos, tal como lo sugieren los autores citados.

Al comparar la eficiencia de remoción alcanzada por los tratamientos del presente estudio, se tiene que; el tratamiento uno (T1) con un menor número de células bacterianas de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 agregadas al inicio del experimento (1×10^8 UFC/ml), obtuvo niveles de remoción más altos de la DBO₅ y DQO (54,79 % y 52,34 %) respectivamente, a diferencia de (T2) y sobre todo del tratamiento (T3) quien albergó el mayor número de células bacterianas al inicio del ensayo (2×10^8 UFC/ml) pero obtuvo los niveles de remoción porcentual más bajos (43,35 % de DBO₅ y 41,75 % de DQO); evidenciando una proporcionalidad inversa entre la concentración bacteriana y los niveles de reducción logrados. En contraste, investigaciones como las de Miranda (2018) o Botello *et al.* (2016) sugieren que una concentración bacteriana más elevada en el medio, permite alcanzar niveles de descontaminación más altos y satisfactorios. No obstante, dichos estudios se efectuaron en intervalos de tiempo cortos o con flujos continuos de carga orgánica; 40 horas de tratamiento en el caso de Miranda (2019) y flujos de 2,7 kg DQO m³d⁻¹ en el caso de Botello *et al.* (2016); dichos factores podrían contribuir al aseguramiento en la disponibilidad continua de alimento en el medio de tratamiento de tal manera que las células bacterianas no alcancen la fase estacionaria o de muerte.

Por su parte, Azoddein *et al.* (2015) determinaron las fases de crecimiento de *Pseudomonas putida* en un medio líquido con agitación y en un biorreactor destinado a tratar aguas residuales provenientes de la producción de palma aceitera, encontrando similitud entre las fases de crecimiento de ambos medios; más aún, los autores muestran que, a partir de las 48 horas de tratamiento, la cepa bacteriana experimenta la fase de muerte dada la falta de nutrientes. En base a lo revisado, tenemos que el acelerado crecimiento que mostró *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en el medio de cultivo líquido, supondría un comportamiento similar en el medio experimental; además, el extenso periodo de tratamiento (cinco días) y la poca disponibilidad de materia orgánica en el medio (61,58 mg/L de DBO₅ al inicio del ensayo), son factores que habrían contribuido a que la cepa bacteriana experimente una amplia fase de muerte, dando cabida a una acumulación de desechos y productos metabólicos secundarios que limitan la biorremediación y que generan nueva materia orgánica en descomposición (Flórez, 2016). Dicho fenómeno resulta congruente con los niveles de DBO₅ más altos reportados en T3,

tratamiento con una concentración de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 más elevada al inicio del ensayo.

4.4. Efectos sobre el pH, conductividad eléctrica y temperatura, de los efluentes de la PTAR Collique, por influencia de *Pseudomonas putida* ATCC 49128® inmovilizadas en espumas de poliuretano

pH

En lo que refiere a la variación en los niveles de pH, la presente investigación obtuvo resultados con fluctuaciones entre $7,46 \pm 0,057$ y $8,23 \pm 0,057$ en promedio para los tres tratamientos aplicados, los cuales según la prueba de Tukey no presentan disparidad significativa entre sí; a diferencia del tratamiento control que presentó diferencia estadística respecto a los demás tratamientos, con una fluctuación de pH entre $6,60 \pm 0,100$ y $7,33 \pm 0,057$. En todos los casos se evidenció una tendencia ascendente hasta el cuarto día de ensayo y una disminución del pH hacia el final del mismo (día 5). En ese sentido, Pimentel *et al.* (2018) durante el desarrollo de un experimento para depurar residuos líquidos de origen doméstico haciendo uso de bacterias del género *Pseudomonas*, obtuvieron como resultado una variación ascendente del pH entre 7,1 a 7,6; por otro lado, Flórez (2016), reporta una fluctuación más amplia en los niveles de pH (entre 5 y 7,5), en la cual se observa un rápido descenso al inicio del ensayo y un ligero incremento de los valores de pH al final del mismo; en este caso, la amplia variación de pH pudo verse influenciada por los bajos niveles de pH inicial que presentaron las muestras de agua a tratar (efluentes lácteos), tal como lo indica el autor.

Como se ha visto en las investigaciones citadas, es usual observar un incremento o disminución de los niveles de pH durante los procesos de biorremediación con *Pseudomonas putida* o alguna especie de este género; dado que durante la degradación de los compuestos orgánicos, como parte del proceso de mineralización del carbono, esta cepa tiende a generar polímeros extracelulares y dióxido de carbono (CO₂), los cuales influirían en la variación de los niveles de pH; además, Nikel y Lorenzo (2018) señalan que el cambio de temperatura e intercambio de

gases disueltos en el medio experimental, también son factores influyentes en la variación de los niveles de pH, sobre todo en volúmenes de agua pequeños y por ende con baja capacidad de amortiguación.

En ese sentido, los tratamientos del presente estudio mostraron niveles de pH con poca variación y, a pesar de que se evidenciaron disimilitudes de tipo significativas entre tres de los tratamientos y el control ($p < 0,05$), todos mostraron fluctuaciones de pH entre 6 a 8, rango recomendado para maximizar los procesos de biorremediación con *Pseudomonas putida* (Gómez *et al.*, 2008). Adicionalmente, el referido autor indica que los procesos de biorremediación son más efectivos a niveles de pH cercanos a la neutralidad (pH 7), ya que de lo contrario dichos procesos se vuelven más lentos y en consecuencia menos eficientes. Por su parte, Morillo y Guevara (2014) refuerzan esta idea, dado que en su investigación evalúan el grado de remoción del cianuro por efecto de *Pseudomonas*, sometidas a distintos niveles de temperaturas y pH, concluyendo que el mayor porcentaje de remoción fue alcanzado a un nivel de pH más bajo (9,5), a diferencia de los otros dos tratamientos con pH de 10 y 10,5. Por lo que, se concluye que los niveles de pH de la presente investigación, experimentaron poca variabilidad (con fluctuaciones entre 6,6 y 8,2), encontrándose entre los niveles óptimos para el proceso de biorremediación con *Pseudomonas putida*; lo cual habría favorecido en la disminución significativa de las cargas contaminantes de los efluentes alcanzados.

Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica (CE) de los tratamientos (T1, T2 y T3) fluctuaron entre 1300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$; T2 y T3 albergaron los mayores niveles de CE sin mostrar diferencias significativas entre sí, según la prueba de Tukey aplicada; en cambio T1 presentó diferencias significativas con todos los tratamientos, al igual que el tratamiento control (T0), el cual albergó los niveles de CE más bajos, entre 240 y 320 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Esta marcada diferencia pudo deberse a que la CE inicial del efluente, sometida a los primeros tres tratamientos, fue de 1210 $\mu\text{S}/\text{cm}$; mientras que la CE inicial del tratamiento T0 (control) fue nula, dado que se utilizó agua destilada en reemplazo de agua residual efluente. Por otro lado, teniendo en cuenta los niveles

de CE al inicio y al final del ensayo, se evidenció una reducción promedio de 9,09 % para los tratamientos T2 y T3; a su vez, el tratamiento T1 experimentó una reducción de 2,97 %; por el contrario, el tratamiento control T0 mostró un incremento en los niveles de conductividad eléctrica del 25 % al final del experimento. Resultados con tendencia similar son reportados por Pimentel *et al.* (2018), quienes al tratar aguas residuales con bacterias del género *Pseudomonas* por un periodo de cinco días, obtuvieron una reducción significativa de la conductividad eléctrica ($p < 0,05$), con valores que fueron de 748 a 385 $\mu\text{S}/\text{cm}$, lo cual representa una reducción del 48,53 %.

Considerando lo indicado por Solís *et al.* (2018), que la conductividad eléctrica, es un indicador indirecto de la dureza del agua y del contenido de sales que esta alberga; el presente estudio no alcanzó una remoción porcentual considerable de este parámetro, debido a la posible interferencia de algún elemento traza no determinado en el medio experimental, lo cual podría haber mermado la captación de iones por parte de la célula bacteriana, Higham *et al.* (1985); no obstante, si se evidenció disparidad estadística entre los tratamientos ($p < 0,05$). Finalmente, cabe mencionar que los niveles de CE determinados, cumplen con la normativa ambiental vigente, Categoría 3 de los ECA- agua (Aguas destinadas al riego de vegetales y bebida de animales) dada por Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM; puesto que dicha norma establece un valor de 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ como nivel límite de CE.

Temperatura

La temperatura es un factor ambiental de mucha relevancia en los procesos de biorremediación con bacterias del género *Pseudomonas*; en ese sentido, Gómez *et al.* (2008) mencionan que con una variación de la temperatura en 10 °C, el proceso de biorremediación puede llegar a duplicarse; más aún, el autor sugiere que dichos procesos deben llevarse a cabo en un rango de 30 a 35 °C dadas las características mesófilas de la cepa bacteriana, ya que pasados los 40 °C podría producirse una desnaturalización de las células, provocando una disminución en la biodegradación. Al respecto, en el presente ensayo se consideró un nivel de temperatura uniforme de 30 °C (Botello *et al.*, 2016; Morillo y Guevara, 2014); pese a ello, de la medición

diaria a las muestras de agua en el medio experimental, se obtuvo como resultado una fluctuación de temperatura entre $25,36 \pm 0,11$ y $27,47 \pm 0,11$ °C en promedio, no existiendo diferencias estadísticas significativas entre sí ($p = 0,149 > \alpha = 0,05$). Por lo que, se concluye que los niveles de temperatura mantenidos en el presente estudio, contribuyeron en el proceso de biorremediación alcanzado.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

1. Dadas las condiciones de laboratorio descritas en el presente estudio, y la remoción máxima de la DBO₅ alcanzada de 54,79 %, se concluye que el efecto producido por *Pseudomonas putida* ATCC 49128 en la reducción de la DBO₅ de efluentes de PTAR Collique, fue significativo.
2. La cepa bacteriana *Pseudomonas putida* ATCC 49128 muestra un crecimiento óptimo, alcanzando una concentración de 11×10^{10} UFC/ml en las primeras 11 horas; además, de que los parámetros cinéticos de crecimiento determinados, se encuentran dentro del espectro de valores señalados por otras investigaciones.
3. Los efluentes de la PTAR Collique, presenta características fisicoquímicas acordes a la normativa ambiental vigente, dado que ninguno de los parámetros supera los LMP para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales, establecido por Decreto supremo N° 003-2010-MINAM; por lo que, no supondrían un riesgo social y ambiental de acuerdo a los parámetros evaluados en el presente estudio.
4. La cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128, es una bacteria con alto potencial biotecnológico, puesto que redujo significativamente la DBO₅ y DQO de los efluentes de PTAR, con porcentajes de 54,79 y 52,34 % respectivamente. Cabe indicar que, el proceso de biorremediación se llevó a cabo sin aplicar aireación ni movimiento; ello sumado a los factores como el extenso periodo de tratamiento (5 días) y la poca disponibilidad de materia orgánica aprovechable como fuente de carbono en el medio experimental (61 mg/L), habrían limitado de manera sustancial la capacidad depuradora de la cepa bacteriana.

5. La cepa bacteriana *Pseudomonas putida* ATCC 49128 influyó en la variación de los niveles de pH, fluctuaciones entre 6,6 y 8,2, y conductividad eléctrica, valores en el orden de 1300 y 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$; encontrándose dentro del rango óptimo para los procesos de biorremediación, y sin superar los valores establecidos en la normativa ambiental vigente. Por otro lado, los niveles de temperatura fluctuante entre 25,3 y 27,3 $^{\circ}\text{C}$, contribuyendo de manera efectiva en la remoción de la DBO_5 y DQO; por lo que, el control y monitoreo de este parámetro es determinante en los procesos de biorremediación de las aguas residuales, utilizando *Pseudomonas putida* ATCC 49128.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

1. En caso se estudie el crecimiento de *Pseudomonas putida* mediante el método de dilución y siembra en placa, se recomienda realizar diluciones hasta el orden de 10^{10} como mínimo, dado el rápido crecimiento que tiene la cepa bacteriana.
2. Teniendo en cuenta las diferencias metodológicas del presente estudio respecto a otras investigaciones, se recomienda aplicar movimiento y aireación en los procesos de biorremediación con *Pseudomonas putida*, para depurar efluentes de PTAR; ya que dichos factores podrían potenciar la capacidad depuradora de la cepa.
3. También se recomienda estimular la capacidad depuradora de *Pseudomonas putida* en tiempos de tratamiento más cortos (entre 48 y 72 horas), y sobre muestras de agua residual que alberguen cargas contaminantes más elevadas; de tal forma que se propicie una alta disponibilidad de materia orgánica aprovechable en el medio.
4. Dados los sobresalientes resultados obtenidos en el presente estudio, así como los reportados en otras investigaciones; se recomienda realizar inmovilización por adsorción de *Pseudomonas putida* en espuma de poliuretano, para el tratamiento de aguas residuales; puesto que, entre otros, contribuye al rápido crecimiento y adaptación de la cepa bacteriana, haciendo posible una mayor remoción de las cargas contaminantes del agua.
5. Finalmente, se recomienda evaluar parámetros adicionales, tales como sólidos totales en suspensión, *Coliformes termotolerantes*, nitratos y fosfatos, lo cual permitiría tener un panorama más amplio respecto a la calidad de los efluentes de PTAR y la efectividad de la cepa *Pseudomonas putida* utilizada como agente biorremediador.

REFERENCIAS

- Acosta, J., Gómez, M., y Narváez, S. (2008). Coliformes termotolerantes en aguas de las poblaciones costeras y palafíticas de la Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 113-121. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319028004009>
- Akpor, O., y Muchie, M. (2011). Environmental and public health implications of wastewater quality. *African Journal of Biotechnology*, 2379-2387. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/93165/82578>
- Albert, L. (2011). Contaminación ambiental: origen, clases, fuentes y efectos. *Sociedad Mexicana de Toxicología*. AC Xalapa.
- American Public Health Association. (1992). *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. España, Madrid: Díaz de Santos, S.A.
- Anaya, J. (2019). *Evaluación de la remoción de nitrógeno total y fósforo total presentes en las aguas del Humedal de Santa Rosa mediante la bacteria Pseudomonas putida ATCC 49128*. (Tesis de grado). Universidad Católica Sedes Sapientiae, Huacho, Perú. <http://repositorio.ucss.edu.pe/handle/UCSS/654>
- Angel, M. (1994). *Contribución al estudio de la demanda bioquímica de oxígeno*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. <http://eprints.uanl.mx/7204/1/1020091184.PDF>
- Aquihuatl, M., y Pérez, M. (2004). *Manual de prácticas del laboratorio microbiología general*. México, D.F: Unidad Iztapalapa.
- Aquihuatl, M., Volke, T., Prado, L., Shirai, K., Ramírez, F., y Salazar, M. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio Microbiología general*. México, D.F: Casa abierta al tiempo.
- Aznar, A. (2000). Determinación de los parámetros físico-químicos de calidad de las aguas. *Revista interdisciplinaria de gestión ambiental*, 2(23), 12-19.

- Azoddein , M; Bustary , B; Azli, A; Abidin , Z; Ali, M; y Desa, M;. (2015). Study of palm oil mill effluents treatment using bioengineered structure biomedica. *Journal of Engineering and Technology*, 67-74.
- Bedoya, J., Castaño, G., y Ochoa, S. (2019). Tolerance level of native *Pseudomonas spp.* wastewater from Aburrá Valley. *Colomb. Biotecnol*, 68-76. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v21n1/0123-3475-biote-21-01-135.pdf>
- Botello, W., Ortiz, J., y Peña, S. (2016). Inmovilización microbiana en polímeros sintéticos para el tratamiento de aguas residuales. *NOVA*, 99-106. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a10.pdf>
- Bustos, C. (2017). *Desarrollo de un método para recuento de Listeria monocytogenes utilizando turbidimetría* (Tesis de grado), Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/26331>
- Carbonel, J. (2020). Gestión ambiental sostenible de áreas verdes en el distrito de Comas. (Tesis doctoral). Universidad Cesar Vallejo, Lima, Perú. <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/48596>
- Cedron, O., y Cribilleros, A. (2017). *Diagnóstico del sistema de aguas residuales en Salaverry y propuesta de solución*. (Tesis de grado) Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, Perú. <https://hdl.handle.net/20.500.12759/3561>
- Chitiva, L., y Dussán, J. (2003). Evaluación de matrices para la inmovilización de *Pseudomonas spp.* en biorremediación del fenol. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5-10. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77650201.pdf>
- Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM. (17 de marzo del 2010). Normas Legales, 415675. Diario Oficial El Peruano, 17 de marzo del 2010, pp. 415675-415676.
- Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM. (07 de junio de 2017). Normas Legales, 20170607. Diario Oficial El Peruano. 07 de junio de 2017, pp. 10-19.
- Di Rienzo , J., Casanoves, F., Gonzalez , L., Tablada , E., Díaz, M., Robledo , C., y Balzarini, M. (2005). *Estadística para las Ciencias Agropecuaria* . Cordova : ISBN.

- Farfán, M. (2015). *Evaluación de la eficiencia del tratamiento de las aguas residuales domésticas para el riego de áreas verdes en el sistema de lodos activados de la planta piloto de la FIARN-UNAC*. (Tesis de grado). Universidad Nacional del Callao, Callao, Perú.
- Feachen, R., Bradley, D., Garelick, H., y Mara, D. (1983). *Sanitation and Disease Health Aspects of Excreta and Wastewater Management*. Washington, D.C: John Wiley & Sons. <http://documents.worldbank.org/curated/en/704041468740420118/pdf/multi0page.pdf>
- Flórez, D. (2016). *Evaluación de la eficiencia de un tratamiento biológico aerobio mediante el uso de las bacterias *Pseudomona putida*, *Pseudomona mendocina* y *Hafnia alvei*, como alternativa de tratamiento para vertimientos líquidos de una industria láctea*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Dosquebradas, Colombia. <https://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/6298/1/1057305033.pdf>
- Garzón, J., y Barragán, H. (2008). Inmovilización microbiana: técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista Sistemas Ambientales*, 2(1), 23-34.
- Garzón, J., Rodríguez, J., y Hernández, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad y Salud*, 309-318. <https://doi.org/10.22267/rus.171902.93>
- Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Losada, M., y Mantilla, P. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA*, 101-212. <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/398/1158>
- Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cazáres, L., Mendoza-Orozco, M., Díaz-Marina, J., Burguete-Gutiérrez, J., y Feliciano-Guzmán, M. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2), 95-102. <http://ve.scielo.org/pdf/rsvm/v35n2/art07.pdf>
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, M. (2014). *Metodología de la investigación* (6th ed.). México D.F: McGrawHill. https://periodicooficial.jalisco.gob.mx/sites/periodicooficial.jalisco.gob.mx/files/metodologia_de_la_investigacion_-_roberto_hernandez_sampieri.pdf

- Higham, D., Sadler, P., y Scawen, M. (1985). Cadmium resistance in *Pseudomonas putida*: growth and uptake of cadmium. *Microbiology*, 131(10), 2539-2544. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-131-10-2539?crawler=true>
- Johnsen, K., y Nielsen, P. (1999). Diversity of *Pseudomonas* strains isolated with King B and Gould S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterisation. *Microbiology Letters*, 155-162. <https://academic.oup.com/femsle/article/173/1/155/554841>
- Lacal, J. (2008). *Caracterización bioquímica y molecular del sistema de dos componentes TODS/TODT de Pseudomonas putida DAT-TIE*. (Tesis doctoral). Universidad de Granada, Granada, España. <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/1838/17367219.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Loh, K.-C., y Cao, B. (2008). Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida* - A review of proteomics studies. *Enzyme and Microbial Technology*, 1-12.
- Lopes, L., Weisberg, A., Davis, E., Varize, C., Pereira e Silva, M., Chang, J., y Andreote, F. (2019). Genomic and metabolic differences between *Pseudomonas putida* populations inhabiting sugarcane rhizosphere or bulk soil. *Plos one*, 14(10).
- Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. (2009). *Brock Biología de los Microorganismos*. (10a. ed.) España, Madrid: Pearson Prentice Hall.
- Mansour , H., Mechri, B., Ghedira, K., Barillier, D., Mosrati, R., Hammami, M., y Ghedira, L. (2011). Treatment of Olive Mill Wastewaters by *Pseudomonas putida* mt-2: Toxicity Assessment of Untreated and Treated Effluent. *Environmental Engineering Science*, 835-841. doi:10.1089/ees.2010.0236
- Martínez, M., y García, M. (2012). Revisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 55-73. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v11n1/v11n1a5.pdf>

- Marrero, J., Díaz, A., y 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. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181221644010.pdf>
- Mayarí, R., Espinosa, M., y Gutiérrez, J. (2005). Validación de la Demanda de Oxígeno Disuelto y Demanda Bioquímica de Oxígeno en aguas y aguas residuales. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181620511015>
- Mayta, S., y Vela, S. (2015). *Tratamiento biológico del cromo (VI) con Pseudomonas Putida en un biorreactor airlift de tubos concéntricos*. (Tesis de grado) Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo, Perú. <http://hdl.handle.net/20.500.12894/3738>
- Mena, M., y Rafael, H. (2016). *Biorremediación de metales pesados con aislados microbianos procedentes de pasivos ambientales mineros y aguas del río Hualgayoc-Cajamarca*. (Tesis de Grado) Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú. <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/994>
- Metcalf y Eddy. (1995). *Ingeniería de las aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización*. Madrid: McGraw-Hill.
- Ministerio del Ambiente [MINAM] (2012). *Glosario de términos para la gestión ambiental peruana*. Lima, Perú.
- Ministerio de Vivienda Construcción y Saneamiento [VIVIENDA] (2006). Norma OS.090 Planta de Tratamiento de Aguas Residuales. Diario Oficial El Peruano: Lima, Perú, pp. 84-104.
- Ministerio de Vivienda Construcción y Saneamiento [VIVIENDA] (2013). Protocolo de Monitoreo de la Calidad de los Efluentes de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales. Resolución Ministerial N° 273-2013-VIVIENDA. Lima, Perú, 24 de octubre del 2013. <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/23087/RM-273-2013-VIVIENDA.pdf>
- Miranda, K. (2019). *Efecto de diferentes concentraciones de Pseudomonas sp en la biorreducción de cromo VI en agua residual de curtiembre de la provincia de Trujillo, 2017*. (Tesis de grado) Universidad Nacional del Santa, Chimbote, Perú. <http://repositorio.uns.edu.pe/handle/UNS/3200>

- Montenegro, J. (2016). *Eficiencia de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas del distrito el Parco, Bagua Amazonas, abril-octubre 2013*. (Tesis de Maestría) Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Morillo , J., y Guevara, J. (2014). *Degradación de cianuro de sodio por Pseudomonas sp. a dos temperaturas y tres pH*. (Tesis de Grado) Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Nikel, P., y de Lorenzo, V. (2018). *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: from native biochemistry to trans-metabolism. *Metabolic engineering*, 50, 142-155. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717618301502>
- Niño, L. (2009). *Implementación de diferentes técnicas analíticas para la determinación de biomasa bacteriana de cepas Pseudomonas putida biodegradadora de fenol*. (Tesis de grado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. <http://noesis.uis.edu.co/bitstream/123456789/3638/1/131320.pdf>
- Obeso , J. (2017). *Síntesis de polihidroxicanoatos en Pseudomonas putida: estudios bioquímicos, genéticos y ultraestructurales*. (Tesis Doctoral) Universidad de León : León, España .
- Ome, Ó., y Zafra, C. (2018). Factores clave en procesos de biorremediación para la depuración de aguas residuales. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 573-585. <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/1037/1525>
- Orozco , Á. (2005). *Bioingeniería de Aguas Residuales*. Brasil, Rio de Janeiro: Acodal.
- Palleroni, N., Kunisawa, R., Contopoulou, R., y Doudoroff, M. (1973). Nucleic Acid Homologies in the Genus *Pseudomonas*. *Printed in U.S.A*, 333-339. <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/23/4/ijjs-23-4-333.pdf?expires=1582484129&id=id&accname=guest&checksum=98E55D10FF97172C4601EAC2EFEBD73F>
- Pellizzari, E., Marinich, L., Flores, S., y Giménez, C. (2015). Degradación de arsénico por *Pseudomonas aeruginosa* para biorremediación de agua. Estudio preliminar. *Avances en ciencias e ingeniería*, 1-5. <https://www.redalyc.org/pdf/3236/323635882001.pdf>

- Pimentel, G., Flores, R., Alfaro, Y., Villarreal, D., y de la Cruz, A. (2018). Aplicación de bacterias benéficas como modelo experimental para la reducción de sólidos y conductividad en aguas residuales. *Revista de iniciación científica*, 4, 57-61. <https://doi.org/10.33412/rev-ric.v4.0.1821>
- Pérez, M., y Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de bacteriología y virología médica*, 23-42.
- Quinteros, A. (2018). *Modelamiento matemático de la fenomenología de crecimiento de Pseudomonas putida a partir de la cinética utilizando glicerol como sustrato*. (Tesis de grado) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10509>
- Raffo, E., y Ruiz, E. (2014). Caracterización de las aguas residuales y la demanda bioquímica de oxígeno. *Industrial Data*, 71-80. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81640855010>
- Ramalho, R. (2003). *Tratamiento de aguas residuales*. España, Madrid: REVERTE, S.A.
- Reyes, M., Puentes, E., Casanova, E., López, F., Panqueva, J., y Castillo, G. (2018). Inmovilización de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo crudo en matrices orgánicas naturales y sintéticas. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 597-609. doi:10.20937/RICA.2018.34.04.04
- Rojas, R. (2002). Sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y ciencias del Ambiente: Organización Mundial de la Salud*, 1-35
- Romero, J. (2010). Tratamiento de Aguas Residuales: Teoría y principios de diseño. *Escuela Colombiana de Ingeniería*.
- Salinas, A., Santos-Córdova, M., Soto-Cruz, O., Delgado, E., Pérez-Andrade, H., Húad-Marroquín, L., y Medrano-Roldán, H. (2008). Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique. *Journal of Environmental Management*, 115-119. doi:10.1016/j.jenvman.2007.01.038

- Sánchez, K. (2018). *Evaluación del diseño de un fotobiorreactor con iluminación fotovoltaica para la obtención de biomasa Arthrospira platensis (Nordstedt) Gomont empleando agua residual hidropónica*. (Tesis de grado) Universidad Católica Sedes Sapientiae, Lima, Perú. <http://repositorio.ucss.edu.pe/handle/UCSS/537>
- Sánchez, A. (2019). *Optimización de la planta de tratamiento de aguas residuales mediante el sistema de lodos activados de la provincia de Jaén, Cajamarca 2019*. (Tesis de grado) Universidad Cesar Vallejo, Lima, Perú. <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/40729>
- Sigler, A., y Bauder, J. (2017). Alcalinidad, pH, y sólidos disueltos totales. *Well Educated Educación en el Agua de Pozo*. http://region8water.colostate.edu/PDFs/we_espanol/Alkalinity_pH_TDS%202012-11-15-SP.pdf
- Silveira, S., Miranda, C., Cidrao, L., y Tédde, S. (2013). Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 4412-4418. doi:10.5897/AJB12.2677
- Solís, Y., Zúñiga, A., y Mora, D. (2018). La conductividad como parámetro predictivo de la dureza del agua en pozos y nacientes de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 31(1), 35-46. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v31n1/0379-3982-tem-31-01-35.pdf>
- Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., y Painter, P. (1996). *Microbiología*. España, Barcelona: Editorial Reverté, S.A.
- Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento [SUNASS]. (2016). *Diagnóstico de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales en el ámbito de operación de las Entidades Prestadoras de Servicios de Saneamiento*. Lima. <https://www.sunass.gob.pe/doc/Publicaciones/ptar.pdf>
- Takahashi, K. (2018). *Remoción de plomo y cadmio presente en el efluente del río Pativilca, Barranca, Lima por células inmovilizadas de Pseudomonas putida ATCC 49128*. (Tesis de Grado) Universidad Católica Sedes Sapientiae, Huancho, Perú.
- Tirado, O., Tirado, I., Castro, I., Morales, M., Orozco, M., y Barreto, A. (2014). Degradación de materia orgánica por cepas bacterianas en la ciénaga de las Quintas. *Ciencia Actual*, 5-13.

Torres, K., y Zuluaga , T. (2009). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. (Tesis de Grado) Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Tortora , G., Funke, B., y Case , C. (2007). *Introducción a la Microbiología* . España, Madrid: Editorial Médica Panamericana, S.A.

Villee, C. (2003). *Biología* . Mexico, D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A.

Wang, L., Huang, L.-J., Yun, L.-J., Tang, F., Zhao, J.-H., Liu, Y., y Luo, Q.-F. (2008). Removal of Nitrogen, Phosphorus, and Organic Pollutants from Water Using Seeding Type Immobilized Microorganisms. *Biomedical and Environmental Sciences*, 150-156. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0895398808600215>

TERMINOLOGÍA

Bacteria. Microorganismos procariotas que conforman el dominio *Bacteria* y que se diferencian de los microorganismos del dominio *Archaea* (Madigan *et al.*, 2009).

Biorremediación. También denominada “biotecnología ambiental”, comprende el uso de microorganismos vivos, como las bacterias, hongos y/o plantas o sus enzimas, para restaurar el ambiente (Garzón *et al.*, 2017).

Cepa bacteriana. Son denominados como tal, aquel grupo de células bacterianas de la misma especie, dichos aislados bacterianos suelen ser preservados en centros especializados denominados “ceparios” (Gutiérrez-Jiménez, 2015).

Contaminación. Es la presencia de compuestos, organismos o formas de energía; que en tiempos, concentraciones y condiciones determinadas, alteran el equilibrio de determinados ambientes o deterioran los recursos naturales (Albert, 2011).

Demanda bioquímica de oxígeno. Parámetro que permite determinar la cantidad de oxígeno requerido por los microorganismos para degradar la materia orgánica presente en una muestra de agua (Raffo y Ruiz, 2014).

Efluente. Aguas residuales que son descargadas al ambiente, las cuales debe contener una concentración máxima de contaminantes medidos según los límites máximos permisibles (MINAM, 2012).

Inmovilización bacteriana. Es la fijación y/o agrupamiento de células bacterianas en un determinado sustrato; la cual se puede dar por atrapamiento o por adsorción (Botello *et al.*, 2016).

Límite máximo permisible. Referencia de la concentración o grado límite de contaminación que alberga una emisión y que al ser excedida podría ocasionar daños a la salud humana y al ambiente (MINAM, 2010).

Material de soporte. Es aquel material usado como fuente de adsorción, el cual permite la formación de biopelículas microbianas (Botello *et al.*, 2016).

Planta de tratamiento de aguas residuales. Infraestructura que propicia el desarrollo de procesos y operaciones unitarias que permiten depurar las aguas residuales (Metcalf y Eddy, 1995).

Poliuretano. Es un polímero químicamente inerte y de alta porosidad, el cual permite la adhesión microbiana e incluso de componentes orgánicos (Martínez y García, 2012).

APÉNDICES

Apéndice 1. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para los resultados de reducción de la DBO₅

Pruebas de normalidad				
Shapiro-Wilk				
Tratamiento	Estadístico	gl	Sig.	
C	0,907	3	0,407	
T1	0,825	3	0,176	
DBO₅	0,947	3	0,558	
T3	0,929	3	0,487	

a. Corrección de significación de Lilliefors. *Fuente:* Elaboración propia.

Prueba de homogeneidad de varianzas					
de Levene					
		Estadístico	gl1	gl2	Sig.
DBO₅	Se basa en la media	1,434	3	8	0,303
	Se basa en la mediana	0,294	3	8	0,829
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0,294	3	6,327	0,829
	Se basa en la media recortada	1,291	3	8	0,342

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 2. Análisis de varianza de una vía para los resultados de la DBO₅

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1202,191	3	400,730	785,489	0,000
Dentro de grupos	4,081	8	0,510		
Total	1206,272	11			

El resultado indica que al menos una de las medias (tratamientos) es diferente; en otras palabras, hay diferencia estadística significativa entre al menos uno de los tratamientos: Ver la regla de decisión. ($P = sig < 0,05$). *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 3. Prueba de Tukey para los resultados de la DBO₅

HSD Tukey^a (DBO₅)

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
4	3	8,5000			
1	3		27,8367		
2	3			29,7900	
3	3				34,8867
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000. *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 4. Análisis de varianza para los resultados de DBO₅ en porcentaje (%)

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	209,447	2	104,723	60,515	0,000
Dentro de grupos	10,383	6	1,731		
Total	219,830	8			

Hay diferencia significativa entre al menos uno de los tratamientos: Ver la regla de decisión. (P = sig < 0,05). *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 5. Prueba de Tukey para los resultados de DBO₅ en porcentaje (%)

HSD Tukey^a (% DBO₅)

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
3	3	43,3500	
2	3		51,6233
1	3		54,7933
Sig.		1,000	0,058

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

Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000. *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 6. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para los resultados de la DQO

Pruebas de normalidad				
Tratamiento	Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	
DQO	C	0,980	3	0,726
	T1	0,936	3	0,510
	T2	0,942	3	0,537
	T3	1,000	3	1,000

a. Corrección de significación de Lilliefors. *Fuente:* Elaboración propia.

Prueba de homogeneidad de varianzas					
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
DQO	Se basa en la media	0,707	3	8	0,574
	Se basa en la mediana	0,194	3	8	0,897
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0,194	3	5,753	0,896
	Se basa en la media recortada	0,659	3	8	0,600

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 7. Análisis de varianza de una vía para los resultados de la DQO

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3080,047	3	1026,682	5811,409	0,000
Dentro de grupos	1,413	8	0,177		
Total	3081,460	11			

Existe diferencia significativa entre al menos uno de los tratamientos: Ver la regla de decisión. ($P = sig < 0,05$). *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 8. Prueba de Tukey para los resultados de la DQO

HSD Tukey^a (DQO)

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0,05			
		1	2	3	4
4	3	11,3333			
1	3		43,3667		
2	3			45,9000	
3	3				53,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000. *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 9. Análisis de varianza para los resultados de DQO en porcentaje (%)

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	180,683	2	90,342	412,246	0,000
Dentro de grupos	1,315	6	0,219		
Total	181,998	8			

Existe diferencia significativa entre al menos uno de los tratamientos: Ver la regla de decisión. ($P = sig < 0,05$). *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 10. Prueba de Tukey para los resultados de DQO en porcentaje (%)

HSD Tukey^a (% DQO)

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
3	3	41,7600		
2	3		49,5600	
1	3			52,3467
Sig.		1,000	1,000	1,000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000. *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 11. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para los resultados de pH

Pruebas de normalidad				
Shapiro-Wilk				
Tratamientos		Estadístico	gl	Sig.
pH	C	0,913	15	0,150
	T1	0,918	15	0,183
	T2	0,842	15	0,013
	T3	0,847	15	0,016

Fuente: Elaboración propia.

Prueba de homogeneidad de varianza					
Estadístico de					
		Levene	gl1	gl2	Sig.
pH	Se basa en la media	0,466	3	56	0,707
	Se basa en la mediana	0,286	3	56	0,835
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0,286	3	54,778	0,835
	Se basa en la media recortada	0,452	3	56	0,717

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 12. Análisis de varianza de una vía para los resultados de pH

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	9,015	3	3,005	46,249	0,000
Dentro de grupos	3,639	56	0,065		
Total	12,654	59			

El resultado indica que por lo menos una de las medias (tratamientos) es diferente; en otras palabras, hay diferencia significativa entre al menos uno de los tratamientos: Ver la regla de decisión. ($P = sig < 0,05$). *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 13. Prueba de Tukey para los resultados del pH**HSD Tukey^a (pH)**

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
4	15	7,0400	
2	15		7,9067
3	15		7,9200
1	15		7,9733
Sig.		1,000	0,890

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000. *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 14. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para los resultados de temperatura

Pruebas de normalidad				
Tratamientos		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Temperatura °C	1	0,963	15	0,743
	2	0,946	15	0,457
	3	0,855	15	0,021
	4	0,881	15	0,049

a. Corrección de significación de Lilliefors. *Fuente:* Elaboración propia.

Prueba de homogeneidad de varianza					
Estadístico de					
Levene					
		gl1	gl2	Sig.	
Temperatura °C	Se basa en la media	0,755	3	56	0,524
	Se basa en la mediana	0,578	3	56	0,632
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0,578	3	49,382	0,632
	Se basa en la media recortada	0,729	3	56	0,539

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 15. Análisis de varianza de una vía para los resultados de temperatura

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,633	3	0,544	1,848	0,149
Dentro de grupos	16,495	56	0,295		
Total	18,127	59			

El resultado indica que ninguna de las medias (tratamientos) es diferente; en otras palabras, no hay diferencia significativa entre al menos uno de los tratamientos: Ver la regla de decisión. ($P = sig > 0,05$). *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 16. Prueba de Tukey para los resultados de temperatura

HSD Tukey^a (Temperatura)

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0,05
		1
4	15	26,4200
1	15	26,6133
3	15	26,7200
2	15	26,8733
Sig.		0,113

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

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 17. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para los resultados de conductividad eléctrica

Pruebas de normalidad				
Tratamientos		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Conductividad eléctrica	1	0,911	15	0,142
	2	0,940	15	0,381
	3	0,936	15	0,331
	4	0,961	15	0,704

a. Corrección de significación de Lilliefors. *Fuente:* Elaboración propia.

Prueba de homogeneidad de varianzas					
		Estadístico de			
		Levene	gl1	gl2	Sig.
Conductividad eléctrica	Se basa en la media	2,897	3	56	0,043
	Se basa en la mediana	2,326	3	56	0,084
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2,326	3	49,498	0,086
	Se basa en la media recortada	2,826	3	56	0,047

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 18. Análisis de varianza de una vía para los resultados de conductividad eléctrica

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	14150285,000	3	4716761,667	2520,086	0,000
Dentro de grupos	104813,333	56	1871,667		
Total	14255098,333	59			

El resultado indica que por lo menos una de las medias (tratamientos) es diferente; en otras palabras, hay diferencia significativa entre al menos uno de los tratamientos: Ver la regla de decisión. ($P = sig < 0,05$). *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 19. Prueba de Tukey para los resultados de conductividad eléctrica

HSD Tukey^a (Conductividad eléctrica)

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
4	15	284,0000		
1	15		1352,0000	
2	15			1412,00
3	15			1444,66
Sig.		1,000	1,000	0,176

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000. *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 20. Análisis de Varianza para los parámetros cinéticos de crecimiento de *Pseudomonas putida*

ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,38746667	2	0,193733333	1162,4	1,37342E-11	4,2564
Dentro de los grupos	0,0015	9	0,000166667			
Total	0,38896667	11				

El resultado indica que por lo menos una de las medias (tratamientos) es diferente; en otras palabras, hay diferencia significativa entre al menos uno de los tratamientos: Ver la regla de decisión. ($F \text{ crítico} < F$). *Fuente:* Elaboración propia.

Apéndice 21. Valores de Oxígeno (OD) disuelto obtenidos en la determinación de la DBO₅ tras el tratamiento (Día 5)

Unidad experimental	P	(OD) DÍA 0	(OD) DÍA 5	OD (D1 - D5)	DBO ₅	Unidad	% Remoción
T1 - R1	0,075	8,57	6,51	2,06	27,47	mg/L	55,41
T1 - R2	0,07	8,52	6,51	2,01	28,71	mg/L	53,39
T1 - R3	0,075	8,54	6,49	2,05	27,33	mg/L	55,63
T2 - R1	0,08	8,31	5,85	2,46	30,75	mg/L	50,08
T2 - R2	0,085	8,21	5,74	2,47	29,06	mg/L	52,83
T2 - R3	0,09	8,22	5,56	2,66	29,56	mg/L	52,02
T3 - R1	0,08	8,1	5,29	2,81	35,13	mg/L	42,98

T3 - R2	0,085	8,23	5,21	3,02	35,53	mg/L	42,32
T3 - R3	0,085	8,22	5,33	2,89	34,00	mg/L	44,81
C - R1	0,228	7,62	5,61	2,01	8,82	mg/L	-
C - R2	0,25	7,35	5,28	2,07	8,28	mg/L	-
C - R3	0,25	7,25	5,15	2,1	8,40	mg/L	-

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 22. Valores de DQO obtenidos tras el tratamiento, y porcentajes de remoción que representan

Unidad experimental	DQO caracterización (Día 1)	DQO (Día 5)	Unidad	% de Remoción de DQO
T1 - R1	91	44	mg/ L	51,65
T1 - R2	91	43,2	mg/ L	52,53
T1 - R3	91	42,9	mg/ L	52,86
T2 - R1	91	45,6	mg/ L	49,89
T2 - R2	91	45,8	mg/ L	49,67
T2 - R3	91	46,3	mg/ L	49,12
T3 - R1	91	52,7	mg/ L	42,09
T3 - R2	91	53	mg/ L	41,76
T3 - R3	91	53,3	mg/ L	41,43
C - R1	0	11,4	mg/ L	-
C - R2	0	11,7	mg/ L	-
C - R3	0	10,9	mg/ L	-

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 23. Parámetros determinados diariamente durante los 5 días que duró el experimento

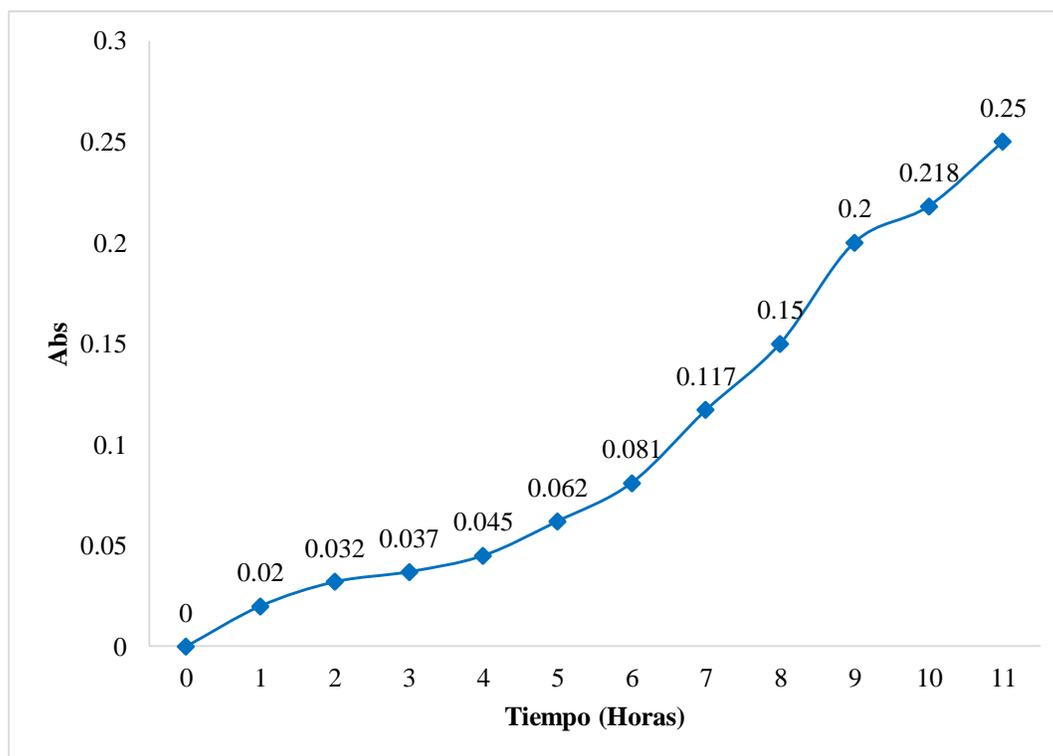
Unidad experimental	Fecha: 28/05/2021			Fecha: 29/05/2021			Fecha: 30/05/2021			Fecha: 31/05/2021			Fecha: 01/06/2021		
	Parámetro			Parámetro			Parámetro			Parámetro			Parámetro		
	PH	Tem. °C	Cond. Elec. µS/cm	PH	Tem. °C	Cond. Elec. µS/cm	PH	Tem. °C	Cond. Elec. µS/cm	PH	Tem. °C	Cond. Elec. µS/cm	PH	Tem. °C	Cond. Elec. µS/cm
T1-R1	7,5	27,4	1340	7,9	27	1360	8	26,3	1390	8,2	26,1	1450	7,9	25,5	1340
T1-R2	7,6	27,2	1370	8	27	1340	8,2	26,8	1350	8,2	26,7	1380	8	26	1290
T1-R3	7,7	27,3	1330	8,1	26,9	1340	8	26,5	1350	8,3	26,6	1360	8	25,9	1290
T2-R1	7,5	27,4	1430	7,9	26,9	1390	8,1	27	1400	8,2	27	1430	8,1	26,3	1340
T2-R2	7,4	27,6	1460	7,9	26,8	1430	8,1	26,9	1440	8,1	26,7	1470	8	26,1	1360
T2-R3	7,5	27,4	1450	7,8	26,9	1350	7,9	26,8	1390	8,1	26,9	1440	8	26,4	1400
T3-R1	7,5	27,5	1510	7,9	26,7	1320	8	26,9	1410	8,2	26,9	1520	8,1	25,8	1410
T3-R2	7,5	27,3	1500	8	26,8	1450	8,1	26,7	1460	8,2	27,1	1480	8,1	25,7	1400
T3-R3	7,4	27,3	1500	7,8	26,7	1390	7,9	26,9	1440	8,1	26,8	1500	8	25,7	1380
C-R1	6,7	26,9	250	6,9	26,6	280	7,2	26,5	300	7,4	26,6	320	7,3	25,3	320
C-R2	6,5	27,2	230	6,9	26,7	270	7,1	26,6	280	7,3	26,4	310	7,2	25,5	310
C-R3	6,6	27,4	240	6,9	26,5	260	7,2	26,5	270	7,3	26,3	290	7,1	25,3	330

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 24. Resultados de los niveles de absorbancia obtenidos por el crecimiento de *Pseudomonas putida* ATCC 49128; dichas mediciones fueron efectuadas con el Espectrofotómetro UV-Visible cada 60 minutos durante 11 horas continuas

Hora	Nivel de Absorbancia
0	0
1	0,020
2	0,032
3	0,037
4	0,045
5	0,062
6	0,081
7	0,117
8	0,150
9	0,200
10	0,218
11	0,250

Fuente: Elaboración propia.



Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 25. Comparación de pruebas de crecimiento de *Pseudomonas putida* ATCC

Autor	Tasa máxima de crecimiento (hora⁻¹)	Tiempo de duplicación (horas)
<i>Presente estudio</i>	0,35	1,98
Takahashi (2018)	0,14	4,93
Anaya (2019)	0,059	11,74
Quinteros (2018)	0,58	3,71

Fuente: Elaboración propia

Apéndice 26. Registro fotográfico de la investigación

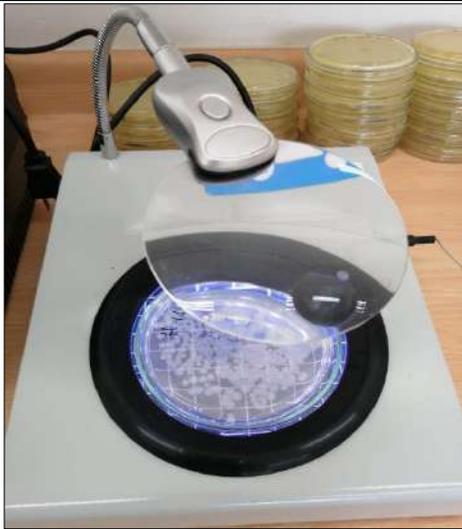
	
<p>Agar base <i>Pseudomonas</i></p>	<p>Cepa de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 activada y preservada a baja temperatura</p>
	
<p>Morfología bacilar de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 observada al microscopio, tras la tinción Gram.</p>	
	
<p>Esterilización de materiales en autoclave.</p>	<p>Micropipetas con agua pectonada para las diluciones.</p>



Calentamiento del agar base *Pseudomonas* antes del plaqueo.



Medio de cultivo solido en placas de Petri.



Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) haciendo uso del contador de colonias digital FJ-3.



Pesaje de medios de cultivo en balanza electrónica.



Medición de parámetros (pH, temperatura y conductividad eléctrica) en unidades experimentales del Tratamiento control (T0).



Medición de parámetros (pH, temperatura y conductividad eléctrica) en unidades experimentales del Tratamiento uno (T1).



Tubos de digestión para DQO, con un rango de 20-800 mg/L



Calentamiento de tubos de digestión de DQO en termorreactor Rocker modelo CR-25



Determinación de Oxígeno Disuelto (OD) en frascos Winkler, con equipo HACH



Multiparámetro HACH HQ40d, con sonda de Oxígeno Disuelto (OD)



Preparación de solución fosfatada (reactivo utilizado en la preparación del agua de dilución para DBO₅).



Preparación de soluciones nutritivas (reactivos utilizados en la preparación del agua de dilución para DBO₅).



Medición de niveles de absorbancia en el espectrofotómetro UV-visible.



Determinación de parámetros de campo con el multiparámetro HANNA modelo HI 9813-6.



Activación de la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 49128, en medio sólido.



Incubación de medios de cultivo sólido, inoculados con *Pseudomonas putida*.