

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**REMOCION DE METALES PESADOS DE EFLUENTES INDUSTRIALES DEL
SECTOR METAL-MECANICO UTILIZANDO UN CONSORCIO BACTERIANO
NATIVO.**

**TESIS PRESENTADA POR LA BACHILLER:
BARRIGA MONTALVO, GRECIA ESTHEFANY**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

ASESOR: ING. JAVIER ROQUE RODRÍGUEZ.

AREQUIPA – PERÚ

2015

"Todo lo que somos es el resultado de lo que hemos
pensado; está fundado en nuestros pensamientos y
está hecho de nuestros pensamientos".

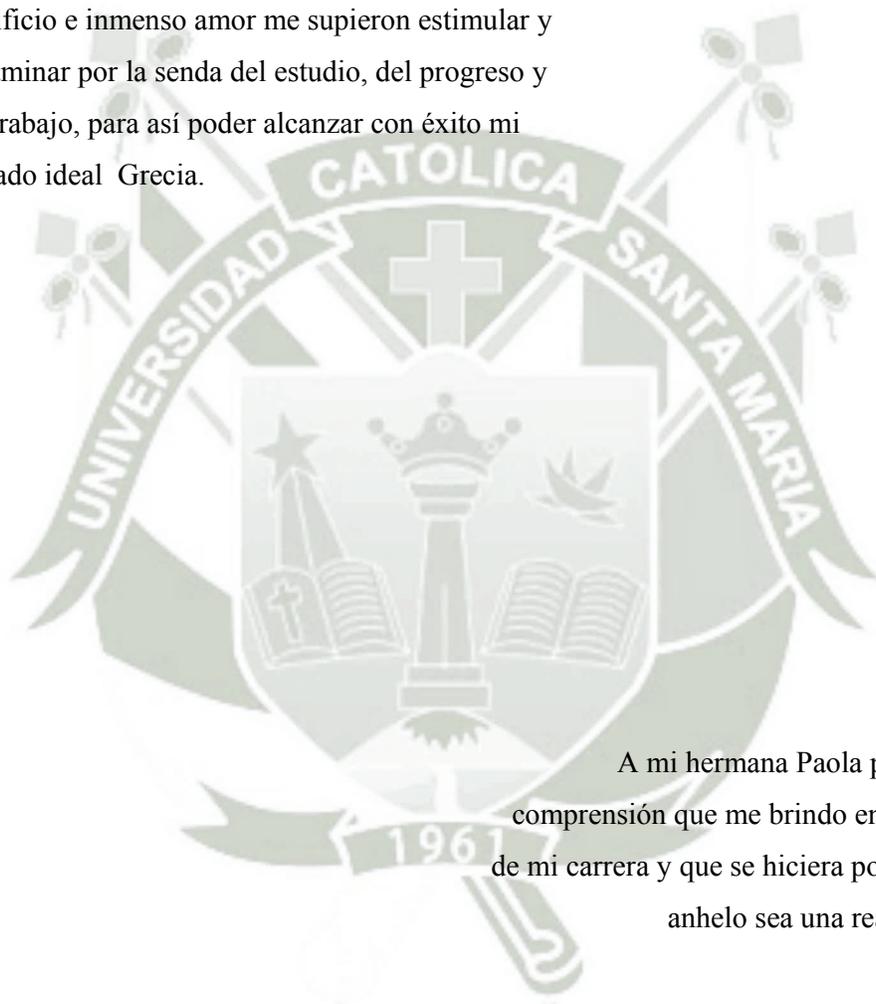
Buda



"La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento,
sino también en la destreza de aplicar los
conocimientos en la práctica"

Aristóteles

Con profundo amor y gratitud a mis queridos padres Magna y Jorge, quienes con su esfuerzo sacrificio e inmenso amor me supieron estimular y encaminar por la senda del estudio, del progreso y del trabajo, para así poder alcanzar con éxito mi ansiado ideal Grecia.



A mi hermana Paola por el apoyo y comprensión que me brindó en el transcurso de mi carrera y que se hiciera posible que este anhelo sea una realidad Grecia.

AGRADECIMIENTO

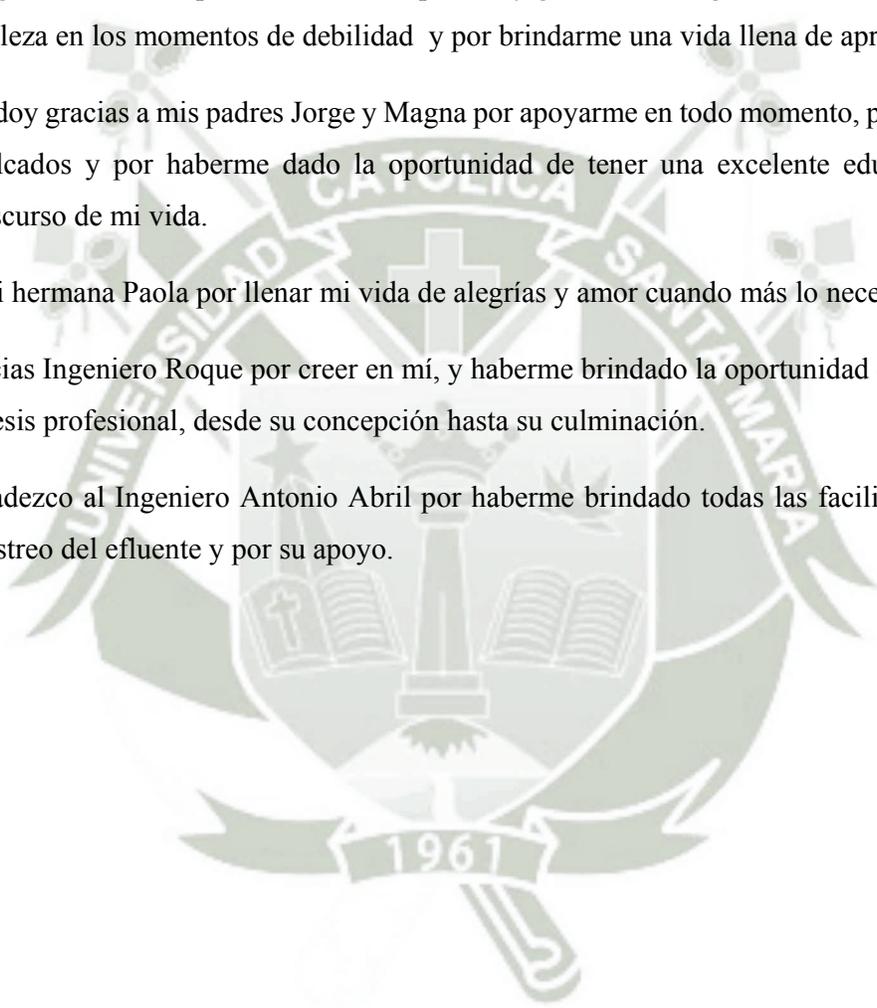
Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes.

Les doy gracias a mis padres Jorge y Magna por apoyarme en todo momento, por los valores inculcados y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida.

A mi hermana Paola por llenar mi vida de alegrías y amor cuando más lo necesito.

Gracias Ingeniero Roque por creer en mí, y haberme brindado la oportunidad de desarrollar mi tesis profesional, desde su concepción hasta su culminación.

Agradezco al Ingeniero Antonio Abril por haberme brindado todas las facilidades para el muestreo del efluente y por su apoyo.



RESUMEN

En la presente investigación se evalúa la capacidad de biorremediación de metales primarios y secundarios, utilizando un consorcio nativo (*Bacillus*, *Pseudomona*, *Klebsiella*) en un sistema de ingeniería (biorreactores). Primero se realizó la caracterización fisicoquímica del efluente industrial-mecánico, demostrando que estos efluentes presentan un alto de contaminación en metales primarios y secundarios por el tipo de actividades que la empresa realiza.

Se realizó el aislamiento microbiológico de las muestras obteniendo 7 diferentes colonias, las cuales se evaluaron para la remoción de metales primarios y secundarios; de las cuales se seleccionaron tres cepas la C2, C4 y C6 que presentaron una mayor remoción, dando valores de absorbancia de 0.22, 0.221 y 0.17, las cepas seleccionadas se caracterizaron macroscópicamente, microscópicamente y bioquímicamente obteniendo; una cepa del genero *Klebsiella spp.*, uno cepa del género *Pseudomona ssp.* y una del genero *Bacillus spp.*

Se determinó los valores óptimos de temperatura en un rango de 25-27 °C y el pH 4, se realizó el estudio del método de biosorción por lotes y el método de biosorción por columna, ambos métodos trabajaron por un periodo de 10 días, en el caso del primer método presento un promedio de remoción del 43.84% en el segundo método presento un promedio de remoción de 54.74 %, demostrando que ambos métodos cumplen con la función de remoción integral de los metales, obteniendo resultados más óptimos en el método de biosorción por columna.

Luego de los resultados obtenidos se optó por el uso de un biorreactor con células inmovilizadas, este resulto ser una de las mejores alternativas para conformar el sistema de biorremoción de metales pesados utilizando los efluentes industriales obtenidas anteriormente. Se diseñó y conformo un biorreactor tubular PFTR, de 20cm. de altura y 4 cm. de diámetro, presentando un enchaquetamiento externo para su termostatación, estos presentaron unos valores de TRH: 98 min, un flujo de 0.15ml/g, $\epsilon = 0.3$, $\psi = 0.7$ y este biorreactor se encontrará empaquetado con cepas de alginato. El PFTR trabajo por 3 semanas de manera continua (25-27 °C, 98 min TRH) proporcionando como resultado promedio de remoción de un 87,86% de todos los metales presentes en los efluentes industriales.

Palabras clave: Bacillus spp, Klebsiella spp, Pseudomona spp., Consorcio, método de biosorción por lote, método de biosorción de columna, PFTR.



ABSTRACT

In the present investigation bioremediation capacity of primary and secondary metals is evaluated using a native consortium (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*) in an engineering system (bioreactors). First the physicochemical characterization of industrial-mechanical effluent was conducted, showing that these effluents have a high contamination in primary and secondary metals by the type of work-out that the company makes.

Microbiological isolation samples was performed to obtain 7 different colonies, which were evaluated for the removal of primary and secondary metals; of which three strains C2, C4 and C6 had a higher removal were selected, giving absorbance values of 0.22, 0.221 and 0.17, the selected strains were characterized macroscopically, microscopically and biochemically obtained; a strain of the genus *Klebsiella* spp. One strain of the genus *Pseudomonas* ssp. and *Bacillus* spp.

Optimum temperature values are determined within a range of 25 to 27 ° C and pH 4, the study was conducted biosorption method and batch method for biosorption column, both methods worked for a period of 10 days, the If the first method presented an average removal of 43.84% in the second method I present an average removal of 54.74%, showing that both methods fulfill the function of comprehensive removal of metals, obtaining optimal results in the method of biosorption by column.

After the results we opted for the use of a bioreactor with immobilized cells, this turned out to be one of the best ways to shape the system biorremoción of heavy metals using industrial effluents obtained above. It was designed and assembled a tubular bioreactor PFTR, 20cm. high and 4 cm. in diameter, presenting an external jacketing for thermostating, these values presented TRH: 98 min, a flow of 0.15mL / g, $\epsilon = 0.3$, $\psi = 0.7$ and this bioreactor was found alginate packaged strains. The PFTR work for 3 weeks continuously (25-27 ° C, 98 min TRH) providing an average result of an 87.86% removal of all metals present in industrial effluents.

Keywords: *Bacillus* spp, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp, Merger, Batch biosorption method, method of biosorption column PFTR.

INDICE

AGRADECIMIENTO	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
CAPITULO I	17
INTRODUCCION	17
1.1 Formulación del problema	17
1.2 Justificación	19
1.3 Hipótesis	19
1.4 Objetivos	20
1.4.1 Objetivo general	20
1.4.2 Objetivos secundarios	20
1.5 Variables e indicadores	21
1.5.1 Variables independientes	21
1.5.2 Variables dependientes	21
CAPITULO II	22
MARCO TEORICO.....	22
2.1 Industria metal-mecánica	22
2.2 Información de la empresa y su ubicación	26
2.3 Normativas generales	28
2.3.1 Ley general del ambiente N° 28611	28
2.3.2 Valores máximos admisibles (VMA) de las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario D.S. N° 021-2009-VIVIENDA	29
2.4 Biotecnología ambiental.....	31
2.4.1 Biorremediación	32
2.5 Microbiología.....	37
2.5.1 Bacillus ssp.....	39
2.5.2 Pseudomona spp.....	40
2.5.3 Klebsiella ssp.	41
2.5.4 Consorcio microbiano	42
2.6 Inmovilización	43

2.6.1 Alginato de calcio	46
2.7 Biorreactor PFTR	48
2.7.1 Características del PFTR	50
2.8 Plasma acoplado por inducción-Espectrometría de emisión atómica- (ICP-AES)	51
CAPITULO III	53
MATERIALES Y METODOS	53
3.1 Lugar de ejecución	53
3.2 Lugar de obtención de la muestra.	53
3.3 Materiales	53
3.3.1 Equipos.....	54
3.3.2 Material de vidrio.....	54
3.3.3 Medios de Cultivo.....	55
3.3.4 Reactivos Químicos.....	55
3.3.5 Material biológico.....	56
3.3.6 Otros materiales	56
3.4 Metodología	56
3.4.1 Toma de muestra.....	56
3.4.2 Aislamiento bacteriano	57
3.4.2.1 Caracterización microscópica	58
3.4.3 Formación de consorcio.....	58
3.4.3.1 Purificación de cepas.....	58
3.4.3.2 Selección de cepas con mejor biorremoción	59
3.4.4 Caracterización microbiológica	59
3.4.4.1 Identificación bioquímica	59
3.4.5 Cinética bacteriana	62
3.4.5.1 Curvas de crecimiento	62
3.4.5.2 Curva de crecimiento del consorcio.....	64
3.4.5.3 Crecimiento bacteriano con variación de temperatura	64
3.4.5.4 Crecimiento bacteriano con variación de pH	65
3.4.6 Inmovilización celular usando alginato de calcio	65
3.4.6.1 Preparación de inóculo	65
3.4.6.2 Entrampamiento de células	65
3.4.7 Estudio del proceso de biosorción.....	66

3.4.7.1 Método de biosorción por lotes	66
3.4.7.2 Método de biosorción por columna.	66
3.4.8 Conformación de un biorreactor PFTR.....	67
3.4.9 Análisis estadístico de los resultados	71
3.5 Flujograma	72
CAPITULO IV	73
RESULTADOS Y DISCUSION	73
4.1 Caracterización del efluente a tratar.....	73
4.2 Aislamiento y caracterización del consorcio obtenido de una muestra de fuente residual.....	76
4.3 Conformación de consorcio.....	77
4.3.1 Purificación de las cepas.....	77
4.3.2 Selección de cepas`	79
4.4 Caracterización de cepas	81
4.5 Crecimiento bacteriano	84
4.5.1 Crecimiento de consorcio con variación de temperatura en el efluente.....	85
4.5.2 Crecimiento Consorcio con variación de pH en el efluente.....	87
4.6 Inmovilización bacteriana	88
4.7 Biosorción de metales.....	88
4.8 Diseño y configuración del biorreactor PFTR.....	93
4.8.1 Requisitos para el funcionamiento del biorreactor	96
4.9 Análisis de la muestra tratada por ICP.....	97
4.10 Análisis ANOVA	101
4.10.1 Análisis estadístico de comparación remoción de metales en de los métodos de biosorción por lotes y biosorción por columna.....	101
4.10.2 Análisis estadístico de la remoción de metales en dos ensayos utilizando el biorreactor tipo PFTR	102
4.11 Comparación de LOS V.M.A. (SEDAPAL) con los resultados obtenidos en el tratamiento para metales.....	103
V. CONCLUSIONES	105
VII. SUGERENCIAS.....	106
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	107
ANEXOS	112
Anexo 1	113

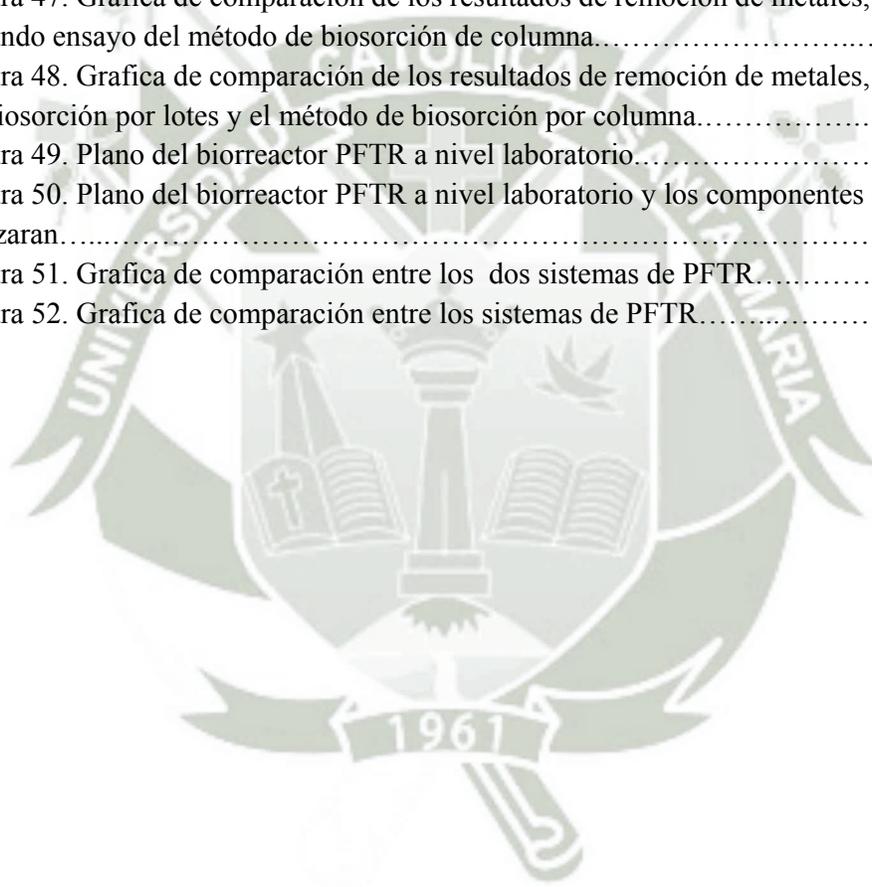
Anexo 2	115
Anexo 3	116
Anexo 4	118
Anexo 5	121
Anexo 6	129



Índice de Figuras.

Figura 1. A) Enfriadores de Acero inoxidable, B) Radiadores Industriales C) Intercambiador de flujo cruzado D) Enfriador.....	27
Figura 2. Ubicación de la empresa metal-mecánica.....	27
Figura 3. Tipos de biorremediación.....	32
Figura 4. Metabolismo microbiano.....	34
Figura 5. Viabilidad de biosorbente para eliminación de efluentes contaminados con metales pesados.....	36
Figura 6. Morfología de las bacterias.....	38
Figura 7. Pared celular Bacterias GRAM +.....	38
Figura 8. Pared celular Bacterias GRAM –.....	39
Figura 9. Foto al microscopio de Bacillus spp, 2µm.....	40
Figura 10. Foto de Pseudomona spp, 3 µm.....	41
Figura 11. Foto de Klebsiella spp, 6 x 7 cm.....	42
Figura 12. Tipos de inmovilización a) Unión química b) Retención física.....	44
Figura 13. Estructura cíclica del ácido manúronico y gulurónico.....	47
Figura 14. Estructura de caja de huevo para alginato de calcio.....	48
Figura 15. Representación esquemática del diferencial de volumen en un reactor tubular flujo pistón.....	49
Figura 16. Ecuación 1, Variabilidad de volumen en PFTR.....	49
Figura 17. Ecuación 2, Diseño de PFTR.....	49
Figura 18. Foto de un ICP-AES; Modelo, óptima DV4300.....	52
Figura 19. Pasos de siembra por agotamiento.....	58
Figura 20. Cuadrados de la Cámara de Neubauer.....	62
Figura 21. Ecuación 3, Determinar el número de células por mililitro.....	63
Figura 22. Ecuación 4, Determinar el número de células por mililitro por el factor de dilución.....	63
Figura 23. Inmovilización celular, metodología de trabajo.....	65
Figura 24. Ecuación5, Determinar el porcentaje de remoción.....	66
Figura 25. Método de columna.....	66
Figura 26. Ecuación 6, Determinar las dimensiones del PFTR.....	67
Figura 27. Ecuación 7, Determinar TRH.....	67
Figura 28. Ecuación 8, Determinar el volúmen total.....	68
Figura 29. Ecuación 9, Determinar el espacio hueco.....	68
Figura 30. Ecuación 10, Determinar el espacio total.....	68
Figura 31. Ecuación 11, Determinar el volúmen hueco.....	68
Figura 32. Diagrama que indica las entradas y salidas del sistema PFTR.....	69
Figura 33. A) CMI 1, B) CMI 2, C) CMI 3.....	76
Figura 34. Caracterización microscópica de las colonias aisladas, A) Foto a 40x. B) Foto a 100x.....	77
Figura 35. A) C1, B) C2, C) C3, D) C4, E) C5, F) C6, G) C7.....	78

Figura 36. Grafica de disminución de remoción de metales por día.....	79
Figura 37. Grafica comparativa entre las cepas bacterianas.....	80
Figura 38. Foto C2 A) características macroscópica B) Caracterización microscópica...81	
Figura 39. Foto C4 A) características macroscópica B) Caracterización microscópica...81	
Figura 40. Foto C6 A) características macroscópica B) Caracterización microscópica...82	
Figura 41. Gráfica de la curva de crecimiento de las cepas C2, C4 y C6.....	84
Figura 42. Gráfica del crecimiento de consorcio en 144 h.....	85
Figura 43. Gráfica del efecto de la Temperatura frente al consorcio.....	86
Figura 44. Gráfica del efecto del pH frente al consorcio.....	87
Figura 45. Pellets de alginato.....	88
Figura 46. Grafica de comparación de los resultados de remoción de metales, del primer y segundo ensayo del método de biosorción de lotes.....	90
Figura 47. Grafica de comparación de los resultados de remoción de metales, del primer y segundo ensayo del método de biosorción de columna.....	91
Figura 48. Grafica de comparación de los resultados de remoción de metales, del método de biosorción por lotes y el método de biosorción por columna.....	93
Figura 49. Plano del biorreactor PFTR a nivel laboratorio.....	94
Figura 50. Plano del biorreactor PFTR a nivel laboratorio y los componentes que se utilizaran.....	95
Figura 51. Grafica de comparación entre los dos sistemas de PFTR.....	100
Figura 52. Grafica de comparación entre los sistemas de PFTR.....	100



Índice de Tablas.

Tabla 1. Variables Independientes e indicadores.....	21
Tabla 2. Variables dependientes e indicadores.....	21
Tabla 3. Operaciones con mayor grado de contaminación en efluentes industriales	24
Tabla 4. Impactos principales generados en el sector metal mecánico	25
Tabla 5. Valores Máximos Admisibles.....	30
Tabla 6. Valores Máximos Admisibles.....	31
Tabla 7. Comparación de polímeros naturales (Carrageno y Alginato) y Polímeros sintéticos (PVA, PEG, PCS), usados en la inmovilización microbiana y es aplicada en la biorremediación de aguas.	46
Tabla 8. Características del esquema de trabajo en el biorreactor PFTR.	70
Tabla 9. Descripción de los elementos del PFTR.	70
Tabla 10. Componentes del agua residual industrial.	74
Tabla 11. Componentes de metales totales.	75
Tabla 12. Comparación de los resultados de espectrofotometría de los tres ensayos para la selección de cepas.....	80
Tabla 13. Resultado de la prueba bioquímica de la cepa C2, C4 y C6.....	83
Tabla 14. Resultados del método de biosorción por lotes y el método de biosorción por columna.....	89
Tabla 15. Muestra el promedio en porcentaje de los ensayos del método de biosorción por lotes y el método del biosorción por columna.....	92
Tabla 16. Datos del tiempo tardado de tres ensayos en que el efluente lleno 10 ml en una probeta.....	96
Tabla 17. Datos del flujo de tres ensayos.....	96
Tabla 18. Dimensiones del tubo del biorreactor PFTR.....	97
Tabla 19. Concentración inicial de metales totales, concentración en el 1er. Ensayo y el 2do. Ensayo del sistema PFTR.....	99
Tabla 20. Cuadro de prueba ANOVA	102
Tabla 21. Cuadro de prueba ANOVA.....	103
Tabla 22. Comparación de los VMA con las concentraciones de los efluentes expuestos a la biorremoción.....	103

Lista de símbolos y abreviaturas.

ε	Espacio hueco
ψ	Espacio ocupado
q	Capacidad de adsorción, mg de soluto/g se sólido.
q_{max}	Capacidad de adsorción máxima, mg de soluto/g se sólido.
C_e	Concentración de equilibrio de soluto en el líquido, mg/L.
b	Constante de Langmuir, L/mg.
t	tiempo espacial.
q_0	Flujo volumétrico de entrada.
C_{A0}	Concentración inicial del reactante.
C_o	Concentración inicial.
C_f	Concentración final.
F	Flujo Volumétrico
C_s	Concentración de sustrato a convertir.
Z	Posición.
q_p	Velocidad específica (masa producto/masa Celular*tiempo).
X	concentración celular promedio por unidad de volumen.
$Y_{p/s}$	Coefficiente estequiométrico.
A	Área normal de flujo.
$C1$	Primera cepa purificada
$C2$	Segunda cepa purificada

C3	Tercera cepa purificada
C4	Cuarta cepa purificada
C5	Quinta cepa purificada
C6	Sexta cepa purificada
C7	Séptima cepa purificada
CMI1	Cepas Aisladas del efluente
CMI2	Cepas Aisladas del efluente
PDA	Medio Agar Papa Dextrosa
VMA	Valores Máximos Admisibles
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DBO5	Demanda Bioquímica de Oxígeno
S.S.T.	Solidos Suspendidos Totales
LMP	Límites Máximos Permisibles
ECA	Estándares de calidad
PFTR	Reactor de tubo con flujo pistón

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Formulación del problema

En los últimos años se ha observado, un gran aumento en la aparición, crecimiento de industrias metal-mecánicas en nuestro país. Como consecuencia afectando y provocando la contaminación del agua con compuestos tóxicos, volviéndose uno de los problemas más graves que afronta el país, induciendo a una fuerte demanda de parte del gobierno y la sociedad en la remediación de las aguas contaminadas, impulsando a la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías de depuración que puedan recuperar estos efluentes, sin provocar ningún efecto secundario en el medio ambiente.

Se conoce que las industrias metal-mecánicas, no tiene un adecuado proceso de tratamiento de efluentes industriales, ya que muchas de ellas eliminan sus efluentes sin tener ningún tratamiento previo lo único que hacen es regular el pH y luego las eliminan en las alcantarillas, mientras otras industrias eliminan sus efluentes a través de la empresa Sedapar S.A quienes les cobran altas cantidades de dinero para recoger los efluentes industriales, el tratamiento proporcionado a los efluentes no nos asegura que eliminan los metales ya que estos no son degradables cuando entran en contacto con el medio ambiente, si no que los inactivan pero este tratamiento no es totalmente efectivo en un 100 % y puede provocar que las personas que se encuentren en contacto con estos efluentes puedan adquirir enfermedades. Porque si no se remedia adecuadamente estos efluentes los efectos crónicos

de los contaminantes (metales pesados) pueden provocar en el ser humano las siguientes enfermedades como el cáncer, defectos de nacimiento, daño de los órganos, desórdenes del sistema nervioso y daños al sistema inmune, además de alterar el ecosistema del lugar donde se desechan estos efluentes que contienen metales pesados.



1.2 Justificación

- La contaminación del agua por metales pesados afectara al medio ambiente, es uno de los más peligrosos debido a su alta toxicidad y su capacidad de acumularse en diferentes organismos causando graves problemas de salud.
- Actualmente se están desarrollando nuevas tecnologías para la eliminación de metales pesados las cuales pretenden, que tenga bajas costos de operación y sean de fácil de implementar.
- El proceso de remoción y recuperación biológica de metales pesados en aguas contaminadas, tiene como ventajas la capacidad de trabajar grandes volúmenes, usar materia renovable, alta selectividad, manipulación de diferentes metales, bajo capital invertido y actuar bajo un amplio rango de condiciones fisicoquímicas.

1.3 Hipótesis

Dado que el efluente industrial generado por la actividad metal-mecánica, contiene microorganismos nativos que pueden ser aislados y caracterizados, es posible que puedan realizar la remoción total y/o parcial de los metales primarios y secundarios.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Remediar metales pesados de efluentes industriales del sector metal-mecánico utilizando un consorcio bacteriano nativo.

1.4.2 Objetivos secundarios

- Caracterizar fisicoquímicamente y microbiológicamente los efluentes residuales de la industria metal-mecánica.
- Determinar la cinética de crecimiento bacteriano de las cepas individuales y en consorcio de aquellas seleccionadas y optimizar la Temperatura y el pH del medio a depurar.
- Evaluar el proceso de biosorción por lotes y biosorción de columna con temperatura y pH óptimo.
- Configurar y diseñar en 2D y 3D un biorreactor tubular PFTR a nivel laboratorio para la remoción de metales primarios y secundarios y evaluar el funcionamiento del biorreactor tubular PFTR a nivel laboratorio para la remoción de metales primarios y secundarios.
- Evaluar la concentración final del efluente industrial tratado en contraste con la normativa que regula los V.M.A. para la descarga de aguas residuales.

1.5 Variables e indicadores

1.5.1 Variables independientes

Tabla 1. Variables Independientes e indicadores.

VARIABLES	INDICADORES
pH	2 a 5
Temperatura	20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36
Procesos de Biosorción	Por lotes
	Por columna
Cepas bacterianas	C2, C4 y C6

1.5.2 Variables dependientes

Tabla 2. Variables dependientes e indicadores.

VARIABLES	INDICADORES
Concentración de metales, (mg/l).	As, Ag, Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb, Se, Sn, Zn.
Concentración de metales, (mg/l).	Al, Ba, Be, Ca, Fe, K, Mn, Mg, Mo, Na, Si, Sb, Sr, V.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 Industria metal-mecánica

La Industria Metal-mecánica, comprende un diverso conjunto de actividades manufactureras, utilizando como sus principales insumos los productos de la siderurgia y sus derivados, aplicándoles a los mismos un tipo de transformación.

Se encarga desde el proceso básico de fundición hasta la industria de Bienes de Capital, por ejemplo elabora; desde artefactos electrónicos hasta estructuras metálicas inmensas, siendo su insumo básico el metal y las aleaciones de hierro; también se encarga de instalarlas y darles mantenimiento.

La industria metal-mecánica se divide en seis sectores:

- Metálicas básicas: Moldeo por fundición, Industrias básicas de aluminio o/y de otros metales no ferrosos.
- Productos metálicos: Columnas, vigas, techos, montajes industriales, etc.
- Maquinaria: Maquinarias y equipos para diversas industrias, calderas, tanques y envases metálicos.
- Material de transporte y carrocerías: Fabricación de vehículos, autopartes, acoplados y otros insumos para el transporte.
- Bienes de capital

Esta industria se encarga de ofrecer bienes y servicios a la minería, sector eléctrico, energético, etc. Es decir contribuye al desarrollo del país en forma integral, fomentando empleo, integración de cadenas de valor, provocando importantes espacios de integración nacional, tanto al nivel de producción como el sistema de innovación nacional. Sus procesos contribuyen a generar inversión, divisas y conocimiento para el crecimiento y desarrollo económico del país.

La industria metal-mecánica genera aguas residuales que proceden de cualquier actividad industrial, ya sea procesos de producción, transformación o manipulación, estas descargas se encuentran con un alto contenido de elementos contaminantes. (Fundación del medio ambiente, 1998)

El efluente de esta industria metal-mecánica es un conjunto de taladrinas, mezclas de aceites y agua. Por la actividades que estas empresas realizan, pero se conoce que uno de los mayores contaminantes presentes en estos efluentes son los metales pesados, por los insumos que utiliza para sus operaciones este tipo de industrias.

El mayor problema respecto a las aguas residuales se centra en las empresas que realizan algún tipo de tratamiento superficial de piezas metálicas (pintura, recubrimiento, soldadura) o la realización de la actividad de prensado.

Existen diferentes tipos de vertidos de la industria metalmeccánica, algunas son más graves, porque presentan una repercusión más grande para el medio ambiente por su elevada concentración de contaminantes, en base a la caracterización de vertidos, se destacan los siguientes:

Tabla 3. Operaciones con mayor grado de contaminación en efluentes industriales

Operación	Parámetros característicos
Prensas de hidroconformación	Mezclas taladrinas-agua, aceites y grasas, sólidos en suspensión.
Lavados de anodizado de aluminio	Metales varios, conductividad, sólidos en suspensión.
Lavados de proceso de pintura de piezas	pH, PO ₄ ³⁻ , sólidos en suspensión.
Limpieza de suelos	Aceites y grasas, sólidos en suspensión.
Refrigeración de máquinas de moldeo/desmolde	Temperatura, aceites y grasas.
Refrigeración de piezas moldeadas	Restos de desmolde, DQO, aceites y grasas.
Mecanizado	Taladrinas, aceites y grasas, sólidos en suspensión, metales.
Pulido de piezas	Sólidos en suspensión, metales varios.
Lavado de recipientes	Aceites y grasas, DQO, sólidos en suspensión, detergentes, pH.
Refrigeración de lingoteras	Temperatura, pH.

Fuente: Fundación Entorno Empresa y Medio Ambiente.

Los contaminantes más importantes a considerar son los metales disueltos y algunos productos químicos, ya que estos productos pueden ser tóxicos incluso a niveles de concentración muy bajos. Los principales impactos que contribuyen la contaminación de las aguas que se generan en el sector son los siguientes:

Tabla 4. Impactos principales generados en el sector metal mecánico

Impacto	Contaminantes que lo provocan
Eutrofización	NO ₃ , PO ₄ ³⁻ , K ⁺ , Ca ⁺² , Mg ⁺² .
Salinización del medio receptor	Aniones y cationes, ácidos y bases.
Consumo de oxígeno disuelto en el medio receptor	DQO, DBO ₅ , COT, aceites y grasas.
Salud y ecosistemas	Sólidos en suspensión, turbidez, DQO, DBO ₅ , COT, pH, metales pesados, aluminio, aceites y grasas.

Fuente: Fundación Entorno Empresa y Medio Ambiente.

El impacto medioambiental de las industrias de este sector, el de mayor problemática es la contaminación de agua por metales pesados, ya que estos son contaminantes no degradables, pero si llegan a degradarse demoran como miles de años para desaparecer del medio natural.

Las actividades de este sector son un conjunto de diversas tecnologías, insumos, etc. Que uno de los contaminantes con mayor impacto que eliminan al medio ambiente son, los metales como plomo, cadmio, arsénico, cromo, etc. que son capaces de causar efectos indeseables en el metabolismo, volviéndose muy dañino para la mayoría de formas vivas debido a que son elementos tóxicos. El ingreso a los ecosistemas está ligado al desarrollo tecnológico y la producción discriminada de desechos, provocando la presencia de altas cantidades importantes en el ambiente, provocando el desequilibrio de los ecosistemas (Fergusson et. al 1990).

Los efectos de los metales sobre el funcionamiento de los ecosistemas varían debido a los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad y se encuentran:

- El desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales.
- Modificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos.
- Ruptura de la integridad de biomoléculas.
- Modificación de otros agentes biológicamente activos. (Cols et. al., 2001)

En el caso de los seres humanos puede provocar diferentes enfermedades dependiendo del metal ingerido, uno de los más conocidos es el plomo que afecta varios sistemas, por ejemplo en el sistema nervioso llega a dañar a las neuronas especialmente las del cerebro. El plomo afecta también a la medula ósea y otro lugar donde es frecuente encontrarlo es el riñón, específicamente en sistema tubular de las nefronas, Otro metal pesado es el cadmio que también afecta al riñón y otro que no es exactamente un metal pero es un contaminante es el arsénico que tienen efecto directo en las mitocondrias. Los daños en si son muy diversos dependiendo de cada metal, pero en general se puede decir que hay lesión celular, (Erostequi, et. al. 2009).

2.2 Información de la empresa y su ubicación

La empresa nace como una alternativa local de suministro de soluciones en transferencia de calor realizando diseño, fabricación y mantenimiento de intercambiadores de calor, desde los equipos más sencillos y difundidos (Radiadores Vehiculares) hasta equipo más complejos (Intercambiadores industriales) permaneciendo en este rubro por los últimos 15 años innovando y desarrollando técnicas propias en nuestros servicios, experiencia que nos acredita y brinda la confianza para realizar todo tipo de trabajo en el que intervienen procesos regidos por las normas ASME, TEMA, ASTM y DIN.

Los servicios que brindan son:

Diseño, fabricación y mantenimiento de:

- Intercambiadores de flujo cruzado de tipo compacto (Radiadores vehiculares Enfriadores de Aceite tipo Microcanal)
- Intercambiadores de tubo y coraza
- Intercambiadores de Placas
- Aeroenfriadores
- Torres de enfriamiento
- Chillers
- Sistemas de enfriamiento en circuito cerrado.

Así mismo realizamos procesos de soldadura certificada para trabajos especiales de los cuales destacamos:

- Recuperación y mantenimiento con soldadura
- Soldadura de material especial
- Estructuras Metálicas

Figura 1. A) Enfriadores de Acero inoxidable, B) Radiadores Industriales C) Intercambiador de flujo cruzado D) Enfriador



Ubicación

La empresa metal-mecánica se encuentra en el distrito de Mariano Melgar, provincia y departamento de Arequipa.

Figura 2. Ubicación de la empresa metal-mecánica



Fuente: Google maps.

2.3 Normativas generales

2.3.1 Ley general del ambiente N° 28611

La ley fue promulgada el 13 de octubre del 2005, se encuentra conformada por IV títulos y 153 artículos. La Ley General del Ambiente, ha sido modificada por las siguientes normas: Decreto Legislativo N° 1055, Ley N° 29263, y Ley N° 29895.

Esta ley se encarga de regular las acciones destinadas a la protección del medio ambiente. El objetivo es mejorar la calidad de vida de las personas y el desarrollo del país mediante la prevención, protección y recuperación del ambiente y sus componentes.

La Ley General del Ambiente establece que el Estado fomenta el tratamiento de las aguas residuales con fines de su reutilización, considerando como premisa la obtención de la calidad necesaria para su reúso, sin perjudicar la salud humana, el ambiente o las actividades en las que se reutilizarán.

Establece también que, las personas jurídicas o naturales podrán obtener del Estado, una autorización previa para el vertimiento de aguas residuales domésticas, industriales o de cualquier otra actividad que desarrollen, siempre que dicho vertimiento no menoscabe la calidad de las aguas como cuerpo receptor, ni se afecte su reutilización para otros fines.

Asimismo, esta ley nos indica los LMP que nos tiene que indicar los parámetros que deben de cumplir antes de ser vertimiento de dichos efluentes.

Título I -Política nacional del ambiente y gestión ambiental.

Capítulo 3- Gestión Ambiental (art. 13-40)

Artículo 32.- Del Límite Máximo Permisible (Modificación D.L N° 1055)

32.1 El Límite Máximo Permisible - LMP, es la medida de la concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, que caracterizan a un efluente o una emisión, que al ser excedida causa o puede causar daños a la salud, al bienestar humano y al ambiente. Su cumplimiento es exigible legalmente por la respectiva autoridad competente. Según el parámetro en particular a que se refiera, la concentración o grado podrá ser expresada en máximos, mínimos o rangos.

32.2 El LMP guarda coherencia entre el nivel de protección ambiental establecido para una fuente determinada y los niveles generales que se establecen en los ECA. La implementación de estos instrumentos debe asegurar que no se exceda la capacidad de carga de los ecosistemas, de acuerdo con las normas sobre la materia.

2.3.2 Ley General De Aguas: Decreto Ley N° 17752

La ley fue promulgada el 24 de junio de 1969, y sus reglamentos y modificaciones legislan sobre la materia del ámbito nacional, (ANEXO I), estableciendo que las aguas sin excepción de alguna son de propiedad del estado y que su dominio es inalienable e imprescriptible. No hay propiedad privada de las aguas ni derechos adquiridos sobre ellas. El uso justificado y racional del agua, sólo puede ser otorgado en armonía, con el interés social y el desarrollo del país, (art-1). También indica que “Ningún vertimiento de residuos sólidos, líquidos o gaseosas podrá ser efectuado en las aguas marítimas o terrestres del país sin la previa autorización de la Autoridad Sanitaria”. (D.S. N° 261-69-AP, Art 57).

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

El presente reglamento establece los estándares nacionales de calidad ambiental para el agua (ANEXO 2). Además, nos indica los parámetros según la categoría del agua.

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

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

Art. 3° DEFINICIÓN DE VALORES MÁXIMOS ADMISIBLES (VMA).- Entiéndase por Valores Máximos Admisibles (V.M.A.), como aquel valor de la concentración de elementos, sustancias o parámetros físicos y/o químicos, que caracterizan a un efluente no doméstico que va a ser descargado a la red de alcantarillado sanitario, que al ser excedido en sus parámetros aprobados (Tabla 5 y 6) causa daño inmediato o progresivo a las instalaciones, infraestructura sanitaria, tratamiento de aguas residuales y tiene influencias negativas en los procesos de tratamiento de aguas residuales.

Tabla 5. Valores Máximos Admisibles

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

Fuente: D.S. N° 021-2009-VIVIENDA

Tabla 6. Valores Máximos Admisibles

PARAMETROS	UNIDAD	EXPRESION	V.M.A.
ALUMINIO	mg/L	Al	10.0
ARSENICO	mg/L	As	0.5
BORO	mg/L	B	4.0
CADMIO	mg/L	Cd	0.2
CIANURO	mg/L	CN	1.0
COBRE	mg/L	Cu	3.0
CROMO HEXAVALENTE	mg/L	Cr +6	0.5
CROMO TOTAL	mg/L	Cr	10.0
FIERRO	mg/L	Fe	2.0
MANGANESO	mg/L	Mn	4.0
MERCURIO	mg/L	Hg	0.02
NIQUEL	mg/L	Ni	4.0
PLOMO	mg/L	Pb	0.5
SULFATOS	mg/L	SO ₄ ⁻²	500
SULFUROS	mg/L	S ⁻²	5.0
ZINC	mg/L	Zn	10.0

Fuente: D.S. N° 021-2009-VIVIENDA

2.4 Biotecnología ambiental

La biotecnología ambiental como el conjunto de actividades tecnológicas que nos permiten comprender y gestionar los sistemas biológicos (principalmente los sistemas microbianos) en el medio ambiente con el fin de proveer a la sociedad de productos y servicios.

Por otro lado uno de los puntos más importantes de la biotecnología ambiental, es la identificación de los contaminante de las aguas, también lo que es la regeneración de estas, debido a que es factor ambiental estratégico en muchos territorios, como por ejemplo en los casos de recuperación de acuíferos, la gestión integral de cuencas fluviales o zonas costeras, o el abastecimiento de recursos hídricos alternativos en las aguas potables de suministro para diferentes actividades industriales y de ocio (Jofre et. al., 2007).

Esta área se encarga de contribuir con el tratamiento de aguas por medios biotecnológicos o el uso de tecnologías biológicas, la diferencia de este tratamiento, con los otros que son más conocidos, es que estos presentan un coste relativamente más bajo y producen una menor alteración del medio ambiente.

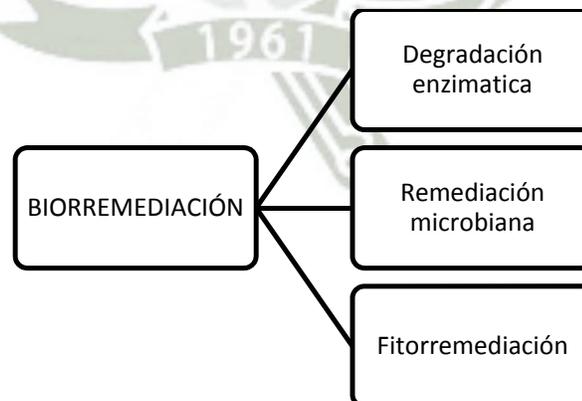
2.4.1 Biorremediación

Es una de las ramas de la biotecnología ambiental es la biorremediación que busca resolver los problemas de contaminación, con la utilización de organismos vivos (microorganismos y plantas) capaces de degradar compuestos químicos tóxicos y otros residuos peligrosos, para reducir o eliminar riesgos medioambientales. Se puede definir el término de biorremediación como un proceso que utiliza la biotecnología en la aceleración de la transformación de los contaminantes en los productos menos tóxicos (Torsvik et al., 1990).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), define biorremediación como “El proceso en el que microbios, típicamente bacteria o hongo, degradan químicos peligrosos a compuestos menos tóxicos o no tóxicos”.

Esta rama de estudio se puede aplicar, en cada uno de los estados de la materia conocidos: sólido, líquido y gases. (Atlas y Unterman, 1999). Otra manera de poder clasificarlos es según a los contaminantes con los que se puede trabajar (Alexander, 1999; Eweis et al., 1999): Hidrocarburos de todo tipo, Hidrocarburos clorados, Compuestos nitroaromáticos, metales pesados, Compuestos organofosforados, cianuros, fenoles, etc. Los procesos de biorremediación pueden ser de tres tipos:

Figura 3. Tipos de biorremediación



Fuente: Argenbio 2007.

- Degradación enzimática

Este tipo de degradación consiste en el empleo de enzimas en el sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas (Moreira; Siquera et. al., 2006). Estas enzimas se obtienen en cantidades industriales por bacterias que las producen naturalmente, o por bacterias modificadas genéticamente que son comercializadas por las empresas biotecnológicas.

- Remediación microbiana

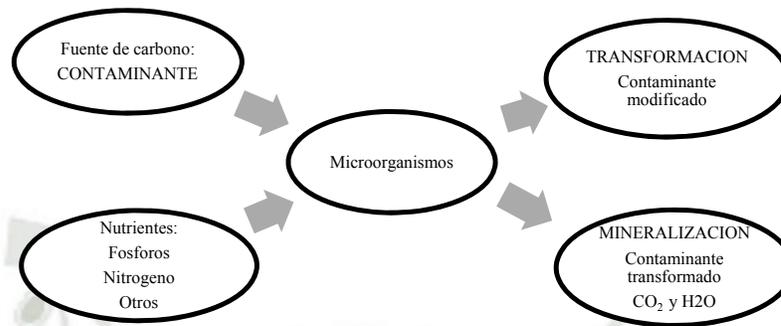
Este tipo de remediación se usa microorganismos directamente en el foco de la contaminación. Las características de los microorganismos biodegradadores: Son que casi todos son eubacterias, poseen actividades de peroxidasas y oxigenasas y tienen la capacidad de transformar moléculas orgánicas en sustancias más pequeñas, que resultan menos tóxicas.

La gran diversidad de microorganismos existente ofrece muchos recursos para limpiar el medio ambiente, existen por ejemplo: bacterias, hongos y levaduras, que pueden degradar con relativa facilidad petróleo y sus derivados, benceno, tolueno, acetona, pesticidas, herbicidas, éteres, alcoholes simples, entre otros (Krepesky et al., 2006). Los metales pesados como uranio, cadmio y mercurio no son biodegradables, pero las bacterias pueden concentrarlos de tal manera de aislarlos para que sean eliminados más fácilmente.

Una de las tecnologías utilizadas en este tipo de biorremediación es el uso de un sistema de descomposición biológica que permitirá el crecimiento controlado de microorganismo, esta tiene el nombre de biorreactor, estos son recipientes que se encargan de mantener un ambiente biológicamente adecuado (temperaturas, pH, humedad, aireación), para cada tipo de microorganismos y estos sobrevivan y crezcan sin ningún problema, estos son utilizados en su mayoría para el tratamiento de aguas negras, grises o producción de diferentes productos.

Las actividades microbianas en el proceso de biorremediación se pueden resumir en el siguiente esquema:

Figura 4. Metabolismo microbiano



Fuente: Argenbio 2007.

Los microorganismos ingieren contaminantes como fuente de carbono y algunos nutrientes. La digestión de estos compuestos en sustancias más simples como parte del metabolismo.

- Fitorremediación

La Fitorremediación es el uso de plantas para limpiar ambientes contaminados, constituye una estrategia muy interesante, debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos.

2.4.2 Biosorción

La Biosorción es una rama de estudio de la biorremediación, es un término que se utiliza en la para referirse a la captación de metales pesados que lleva a cabo una biomasa completa (microorganismos vivos o muertos) y depende del grado de afinidad entre las especies metálicas o sus formas iónicas y los sitios de unión en la estructura molecular de la pared celular, que nos permite acumular estos elementos por diferentes mecanismos, adsorción física, complicación, intercambio iónico, etc. (Raraz et. al., 1995; Volesky et. al., 1995).

Shumate y Strandberg (1985) definen la biosorción como la interacción fisicoquímica no directa que puede ocurrir entre la especie del metal y los compuestos celulares de especies biológicas. Aunque la biosorción es una técnica potencialmente probada para la eliminación de metales a partir de soluciones acuosas a escala de laboratorio, su desempeño en condiciones industriales sigue siendo un desafío (Yun et. al., 2008).

El proceso es relativamente rápido y por el hecho de ser un fenómeno de superficie, facilita la recuperación del metal y el reusó del biosorbente. La utilización favorable de biomateriales en el tratamiento de las soluciones con metales se debe principalmente a sus bajos costes y a la alta eficiencia para eliminar metales de las aguas residuales con bajas concentraciones (Haluk Ceribasi et. al., 2001).

Según Kratochvil y Volesky (1998), las ventajas del proceso son las siguientes:

- Bajo coste.
- Alta eficiencia.
- Minimización de los lodos tanto biológicos como químicos.
- No requiere la adición de nutrientes.
- Regeneración del biosorbente y la posibilidad de recuperación del metal.

Cañizares y Villanueva (2000) han puesto en conocimiento las distintas ventajas e inconvenientes que tiene el emplear una biomasa inerte o células vivas para la eliminación de los metales. Con respecto a las células vivas, aunque estas se pueden saturar, presenta la ventaja de auto-restablecerse mientras crecen, que se puede emplear más de dos organismos de una manera sinérgica.

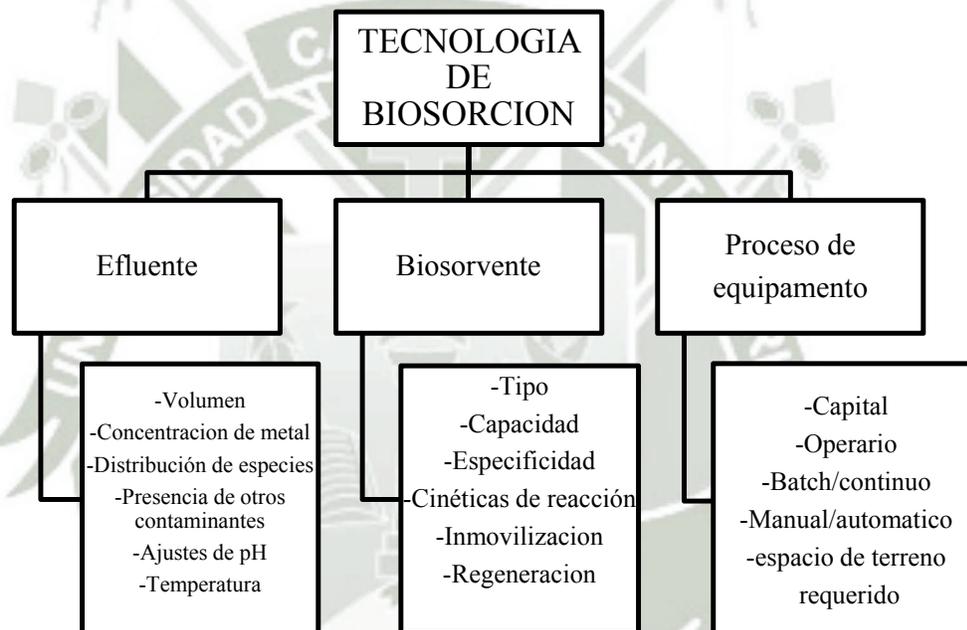
En el proceso de biosorción hay dos fases, la fase sólida que es la biomasa (biosorbente) y la fase líquida que lleva el contaminante que se pretende eliminar por (biosorbato). La alta afinidad que tiene el biosorbente por el biosorbato, logrando el equilibrio entre el metal absorbido por el sólido y la porción del mismo que queda disuelta en la disolución.

Se conocen diferentes candidatos para ser utilizados como material biosorbente, se ha establecido una lista de características que debe reunir para poder ser utilizada como biosorbente:

- Tanto la captura como la liberación del metal deben de ser rápidas y eficientes.

- Debe de producirse a bajo costo y ser reusable.
 - Debe de tener características deseables de tamaño de partícula, forma y propiedades mecánicas.
 - Debe de ser selectivo.
 - La desorción del metal debe de llevarse a cabo fácilmente y en forma económica.
- (Wase Y Forster, 1997)

Figura 5. Viabilidad de biosorbente para eliminación de efluentes contaminados con metales pesados



Fuente: Atkinson, 1998.

Muchas investigaciones se han llevado a cabo con el fin de mejorar el proceso de biosorción, incluyendo la inmovilización de los biomateriales, el mejoramiento, el reusó y optimización del proceso (Wang y Chen et. al., 2006).

La biosorción tiene un costo relativamente bajo, presenta que su capacidad de adsorción depende de los factores de pH y temperatura, es de fácil utilización este proceso, su proceso de selectividad es un poco bajo pero puede ser mejorada por la activación de la biomasa,

mientras su grado de adsorción es muy alto, tanto como absorber una cantidad de elementos tóxicos casi tan alta como su peso (Yun et. al., 2008; Chojnacka et. al., 2010).

El proceso de biosorción se lleva a cabo por diferentes mecanismos fisicoquímicos dependientes de factores ambientales externos, tipo de metal y formación iónica en disolución y del tipo de sitio activo responsable de captar cada metal (Gadd et. al., 1990).

Este mecanismo tiene varias etapas desde el primer contacto de las células con el contaminante (Volesky et. al., 1987):

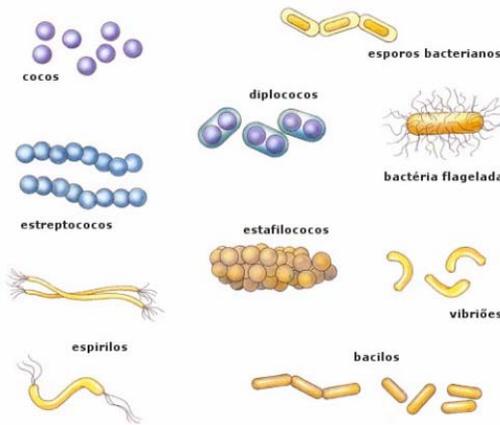
- El transporte del metal desde la solución hasta la primera capa que rodea la pared celular.
- El transporte del metal desde esta capa hasta la pared de la célula y su penetración a través de las membranas.
- Transporte del metal desde la membrana celular a los puntos activos de enlace.
- Fases de enlace: complicación, adsorción y precipitación en la intermembrana.

La eliminación del metal de la solución puede ocurrir por la formación de un complejo en la superficie de la célula después de la interacción entre el metal y los grupos activos (Ercole et. al., 1994). Puede ser dependiente del metabolismo de las células si, en presencia de metales tóxicos, el microorganismo produce los compuestos que favorecen el proceso de la precipitación, si ocurre después de una interacción química entre el metal y la superficie de la célula.

2.5 Microbiología

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas, barras y hélices (Figura 6). Las bacterias son procariontas y, por lo tanto, no tienen núcleo ni orgánulos internos. Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglucanos. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles. (Kueh y Chan, et. al. 1985)

Figura 6. Morfología de las bacterias



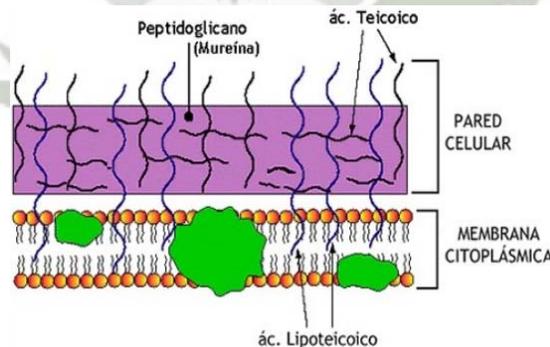
Fuente: José Salsa, 2003.

Se reproducen asexualmente por medio de una forma de división celular denominada fisión binaria, que produce copias genéticamente idénticas a la célula original. En condiciones ideales, algunas bacterias se duplican en cuestión de minutos por lo que podrían en principio, dar origen a una población de millones de bacterias en poco tiempo.

Las bacterias se pueden clasificar en dos tipos:

Bacterias Gram +: Son un grupo de bacterias que no posee una membrana externa capaz de proteger el citoplasma bacteriano.

Figura 7. Pared celular Bacterias GRAM +

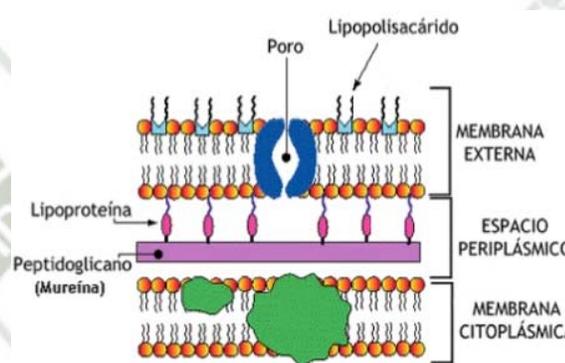


Fuente: Biología, La guía 2000.

Se observa la pared celular de una GRAM + que está compuesta de una capa gruesa de Peptidoglicano y dos clases de ácidos teicoicos: ácido lipoteicoico que se encuentra en la superficie, empotrado en la capa de peptidoglicano y unido a la membrana citoplasmática y Ácido teicoico de la pared que está en la superficie y se une solo a la capa de peptidoglicano.

Bacterias GRAM- : Conforman uno de los principales grupos de bacterias y, cuando se consideran como taxón, también se emplea el nombre de Posibacteria, las cuales además presentan una mayor resistencia a los antisépticos.

Figura 8. Pared celular Bacterias GRAM –



Fuente: Biología, La guía 2000.

Se observa la pared celular de una GRAM - que está compuesta de una capa delgada de Peptidoglicano unida a membrana exterior por lipoproteínas, la membrana exterior contiene proteína, fosfolípido y lipopolisacárido.

2.5.1 *Bacillus* ssp.

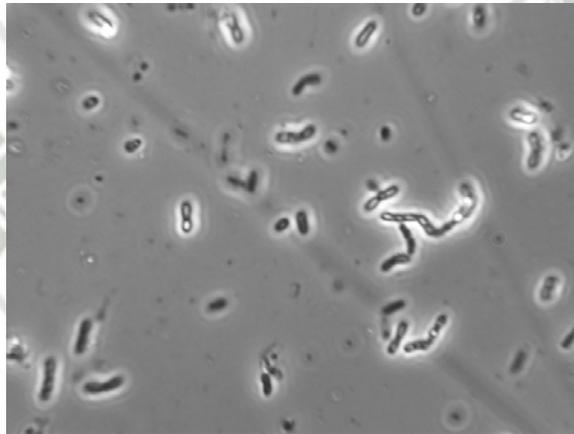
Las bacterias del género *bacillus* pertenecen a la familia Bacillaceae, son bacterias aerobias y anaerobias facultativas, fueron descubiertas en 1872 por COHN. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza; algunos forman parte de la flora normal. Existen 34 especies de bacterias dentro de esta familia, siendo la más tóxica *B. anthracis*. Otros de los miembros del género pueden tener implicaciones médicas, industriales.

Entre las características más importantes de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* están: forma bacilar, movilidad flagelar por flagelos insertados en forma peritrica, pueden llegar a medir de 0,5-2,5 a 1,2-10 μm , además son aerobias estrictas o facultativas, saprófitas, Gram positivas, catalasa positiva, quimiorganótrofas de metabolismo fermentativo o

realizan una respiración aerobia (Holt et. al., 2000). También cumplen importantes roles en los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno. Aparte las bacterias del género *Bacillus* se describen como termófilas (Foster, 2001). Por otra parte, poseen además una alta habilidad fisiológica; soportando altas salinidades y distintos pH (Holt et al. 1984).

La endospora de los *Bacillus* generalmente está formada por proteínas deshidratadas utilizando el ácido poli- β -hidroxibutírico en aerobios y polisacáridos en los anaerobios (Holt et. al., 1984).

Figura 9. Foto al microscopio de *Bacillus* spp, 2 μ m.



Fuente: UCDavis

2.5.2 *Pseudomona* spp.

El género de *Pseudomona* pertenece a la familia Pseudomonadaceae, son bacilos rectos o ligeramente curvados, son Gram negativas, siempre móviles con flagelación polar. Se encuentran en suelos, aguas y ambientes intrahospitalarios, aunque pueden ser patógenos oportunistas en animales (*Ps. aeruginosa*) y patógenos de plantas (*Ps. syringae*) (Palleroni, 1992).

Las especies de *Pseudomonas* contienen plásmidos que tienen la presencia de operones inducibles para la síntesis de enzimas involucradas en la degradación de una amplia variedad de compuestos presentes en el medio. Esta especie es extremadamente rica en plásmidos catabólicos y de resistencia (Jacoby, 1986; Boronin, 1992). Esto confiere una importancia grande a las bacterias del género *Pseudomonas* como digestores aerobios de materiales animales y vegetales, lo que contribuye al reciclaje biológico de materia orgánica.

Algunas bacterias de este grupo producen pigmentos fluorescentes de colores amarillo-verdosos fácilmente solubles en agua. Estos pigmentos actúan como sideróforos: moléculas cuya función es capturar el hierro del medio necesario para el metabolismo del microorganismo

Varias especies de este género participan activamente en el ciclo del carbono en la naturaleza, por lo que se considera entre los organismos más versátiles en la degradación de muchos compuestos (Palleroni, 1993). Con algunas excepciones, no son muy activas en la hidrólisis de moléculas grandes, pero toman ventajas hidrolíticas de otros organismos.

Figura 10. Foto de *Pseudomona* spp, 3 μ m.



Fuente: Confederación Farmacéutica Argentina, 2014.

2.5.3 *Klebsiella* spp.

Los microorganismos del género *Klebsiella* son bacilos gramnegativos inmóviles que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. El género *Klebsiella* está formado por varias especies, entre las que se encuentran *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* y *K. terrigena*. La capa más externa de *Klebsiella* spp. está formada por una gran cápsula de polisacáridos que diferencia a estos microorganismos de otros géneros de esta familia (Ainsworth, 2004).

Son bacterias que presentan capsula como también que no presentan, tienen un tamaño de 0.5 μ m y 2.0 μ m. La morfología microscópica se observa en tinción de Gram, no forma

endoesporas, no tienen flagelo por lo que es inmóvil. Son microorganismos facultativos anaerobios, se producen mejor entre 30 °C y 37 °C. Tienen la enzima de catalasa, ureasa, fermenta muchos carbohidratos y son capaces de formar ácidos fuertes en sus procesos metabólicos.

Klebsiella spp. está presente de forma natural en muchos ambientes acuáticos y pueden multiplicarse y alcanzar concentraciones elevadas en aguas ricas en nutrientes, como residuos de fábricas de papel, plantas de acabado textiles y operaciones de procesamiento de caña de azúcar. Estos microorganismos pueden proliferar en sistemas de distribución de agua, y se sabe que colonizan las arandelas de los grifos. También son excretados en las heces de muchas personas y animales sanos, y se detectan con facilidad en aguas contaminadas por aguas residuales (Bartram J. et al., 2003).

Figura 11. Foto de *Klebsiella* spp, 6 x 7 cm.



Fuente: MicrobeWiki.

2.5.4 Consorcio microbiano

Un consorcio microbiano es una asociación de dos o más poblaciones microbianas de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo. La asociación refleja estilos de vida sinérgicos (comiendo juntos) en el que el crecimiento y el flujo cíclico de nutrientes se conducen de manera más efectiva que si se encontraran individualmente, (López, Domínguez, García, 2007).

Los consorcios pueden desempeñar funciones complicadas, la vida asociada genera mayor resistencia a las fluctuaciones del ambiente y promover la estabilidad de los miembros, en el tiempo, (Brenner, Arnold, 2008).

Las características que deben de poseer los consorcios son las siguientes:

- Comunicación entre miembros por intercambio de sustancias o señales moleculares.
- División del trabajo, simplifica la optimización de cada reacción de conversión.
- Desempeñar funciones que requieren múltiples pasos.
- Comparten los miembros un factor común, por ejemplo condiciones ambientales.
- Actuar rápido y elevada competencia en la rizósfera.
- Sinergismo con cada organismo.
- Capaz de crecer con o sin aire.
- Producir enzimas de modo natural.
- Fácil de manipular y multiplicar la masa.
- Amplio espectro de acción.
- Económico y seguro al medio ambiente.

Los consorcios microbianos pueden resistir mejor los periodos de limitación de nutrientes debido a la diversidad metabólica disponible por la diversidad de especies, combinada con la habilidad de compartir metabolitos dentro de la comunidad. De hecho, el consorcio contiene unas especies minoritarias las cuales han sido retenidas por selección natural para responder a tal situación.

Las ventajas de utilizar un consorcio microbiano son, que los consorcios son más resistentes a cambios ambientales, aparte que tiene una mayor capacidad de manipularse y adecuarse a una variedad de desechos complejos.

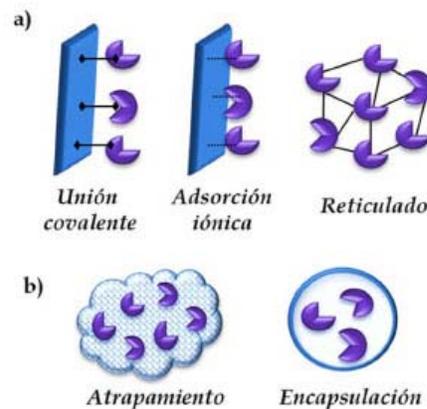
2.6 Inmovilización

La inmovilización de microorganismos ha sido estudiada como la solución y el mejoramiento de sistemas de tratamiento de aguas, suelos y aire que se encuentren contaminados. Aparte de que se conoce que los microorganismos que se encuentran inmovilizados pueden tolerar concentraciones más altas de compuestos tóxicos. Además nos permite la aplicación de nuevas tecnologías como la aplicación de los biorreactores para el tratamiento de los ambientes contaminados.

La inmovilización se define como la agrupación celular a distintos soportes por adhesiones físicas o químicas, debido a eso el microorganismo es capaz de formar agrupaciones por

biopelículas. Según Karel (1985), la inmovilización celular puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada. Provocando atrapamiento en los espacios o poros de fibras y geles, entre muchos, la inmovilización celular puede ser de dos tipos: por unión química y por atrapamiento o retención física. (Figura 15)(Couto et. al., 2004).

Figura 12. Tipos de inmovilización a) Unión química b) Retención física



Fuente: Quím. Nova vol.37 no.3.

Ambos tipos de inmovilización tienen como objetivo, mantener la biomolécula unida o atrapada en un soporte físico, conservando su actividad catalítica y permitiendo el flujo de sustratos y productos.

Las técnicas de inmovilización para microorganismos, se clasifica en:

Inmovilización pasiva: Algunos microorganismos de forma natural tienden a formar aglomerados o unirse a ciertas superficies y crecer en ellas. Durante esta inmovilización puede darse un proceso de formación de biofilms el cual solo tiene un rango de 15-20% corresponde a células vivas. El porcentaje restante está compuesto por agua en su mayoría y por sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Estas complejas estructuras cuentan con sistemas de canales de agua y aireación (Korkoutas et. al., 2004).

La formación de la biopelículas se da en 4 pasos principalmente:

- El primer paso, las células perciben una superficie de adherencia y forman una unión activa reversible por medio de fimbrias, apéndices, pilis, o proteínas de superficie.
- La segunda fase se produce un incremento de la biomasa celular.
- La tercera fase, la biopelícula crece y madura, permitiendo la adhesión de nuevas colonias bacterianas.
- El último paso desprendimiento de la biopelícula para la formación de nuevos conglomerados (Nazar, J. et, al., 2007).

Este tipo de inmovilización ha sido usada con diferentes tipos de matrices tanto naturales como sintéticas, pero según Germeiner (1994) se demostró que las matrices orgánicas son presentan una mayor adsorción.

Inmovilización activa: Las técnicas utilizadas en esta inmovilización es el ataque químico, atrapamiento en los geles naturales o sintéticos y el uso de agentes floculantes (Moreno, Garrido, et, al., 2008).

Los agentes floculantes se usaron inicialmente con el fin de sedimentar partículas suspendidas, evitando así el uso de técnicas como la centrifugación. Actualmente pueden usarse con el fin de permitir que células que por su naturaleza propia no tienden a aglomerarse, lo hagan, permitiendo así el atrapamiento de otras sustancias suspendidas en el medio (Kourkoutas, et al., 2004).

El atrapamiento en una matriz porosa, es uno de los procesos más utilizados. Este puede darse en polímeros sintéticos (resinas, acrilamidas, poliuretanos), proteínas (gelatina, colágeno, albúmina de huevo), o polisacáridos naturales (agares, carragenanos o alginatos) (Moreno-Garrido, et, al., 2008). Consiste en la inmovilización de células dentro de una matriz, la cual impide la difusión de las células en el medio, pero permite el paso de metabolitos y nutrientes (Kourkoutas, et al., 2004).

El procedimiento general para el atrapamiento de las moléculas en gotas de polímeros, consiste es suspender el microorganismo a inmovilizar en una solución líquida que contiene los monómeros de la macromolécula.

Algunas de las ventajas que ofrece este tipo de inmovilización, es que permite la inmovilización de una alta concentración de biomasa, ofrece una alta resistencia a sustancias

tóxicas presentes en el medio (Cohen, Y., 2001). La inmovilización de células en este tipo de matrices ha sido ampliamente aplicada en biorremediación (tabla 7).

Tabla 7. Comparación de polímeros naturales (Carrageno y Alginato) y Polímeros sintéticos (PVA, PEG, PCS), usados en la inmovilización microbiana y es aplicada en la biorremediación de aguas.

Características	Polímeros Naturales		Polímeros sintéticos		
	Carragenano	Ca-Alginato	PVA	PCS	PEG
Solubilidad	Alto	Alto	Bajo/ nulo	Bajo/ nulo	Bajo/ nulo
Biodegradabilidad	Posible	Posible	Bajo	Bajo	Bajo
Estabilidad	Bajo	Bajo	Alto	Alto	Medio
Difusibilidad	Muy bueno	Muy bueno	Bueno	Moderado	--
Crecimiento	Bueno	Bueno	Moderado	Moderado	Bueno
Proceso de inmovilización	Simple	Simple	Laborioso	Laborioso	Laborioso

Fuente: Llenen et. al., 1996.

Ambos tipos de polímeros presentados para la inmovilización celular cumplen con ser una matriz porosa y atrapar al microorganismo dentro de esta para que no tenga contacto con el medio, pero este cuadro nos indicara cual tipo de matriz se debe de utilizar si sintética o natural, dependiendo de las características que tiene que poseer el polímero que se necesita utilizar.

La inmovilización que utilizan diferentes soportes desde los biodegradables como aquellos que son de difícil o nula degradación, presenta las siguientes ventajas:

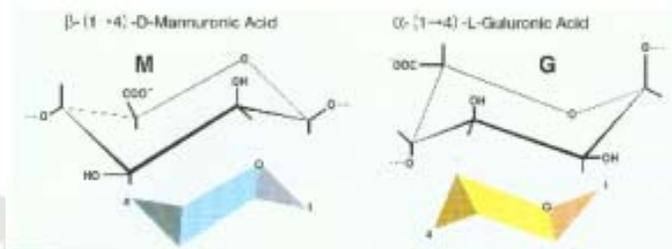
- Actividad metabólica.
- Posibilidad de manejar velocidades de agitación mayores.
- Concentración de biomasa.
- Resistencia a la toxicidad.
- Reutilizar el biocatalizador en otras fermentaciones (Pierotty et. al., 2006).

2.6.1 Alginato de calcio

Es un biopolímero lineal obtenido a partir de la extracción de ácido alginico encontrado en las algas marrones y en algunas bacterias.

El alginato es un polisacárido aniónico distribuido ampliamente en las paredes celulares de las algas marinas pardas.

Figura 13. Estructura cíclica del ácido manúronico y gulurónico.



Fuente: Miguel Calvo.

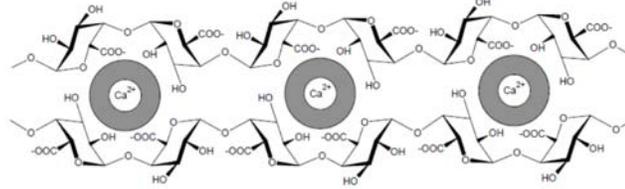
Se encuentran constituidos por los ácidos D-manúronico y L-gulurónico, estas se encuentran agrupadas en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4); y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos α (1 \rightarrow 4), (Mimura et. al., 2001).

La importancia de los alginatos viene dada por la capacidad que estos presentan para formar hidrocoloides. Convirtiéndose de esta manera en modificadores del comportamiento y por tanto útiles como espesantes, estabilizadores y formadores de películas.

Cuando una solución de alginato de calcio se gotea en una solución que contenga iones metálicos divalentes, formara esferas de alginato insolubles en agua. Luego de la formación de las perlas de alginato con iones de calcio, la estructura particular de este biopolímero deja grupos carboxílicos libres que reaccionan con iones metálicos (Veling y Mestdagh, 1995; Ibañez y Umetsu, 2002).

Este gel se forma por la acción coordinada de varias cadenas que se sitúan en paralelo, alojándose en los grupos libres varios iones de calcio. Esta estructura se denomina “CAJA DE HUEVO” (figura 14), y su estabilidad depende de lo bien que estos cationes encajen y formen los bloques de gulurónico.

Figura 14. Estructura de caja de huevo para alginato de calcio.



Fuente: Miguel Calvo.

La presencia de grupos carboxílicos en la estructura del alginato favorece la unión con iones metálicos, las perlas de alginato formadas se utilizan para la eliminación de metales en soluciones con bajas concentraciones (Mimura et. al., 2001).

El alginato puede ser utilizado como adsorbente para la remoción de metales y también de radionucleídos presentes en residuos líquidos (Veglio et. al., 2002).

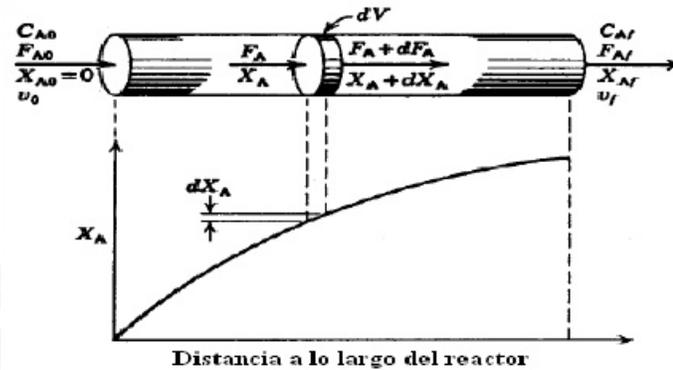
El alginato de calcio es utilizado como matriz de inmovilización de células microbianas utilizando la técnica de entrapamiento. La inmovilización sirve para mejorar las características físicas de la biomasa para el uso de reactores, aparte de que facilita el proceso de separación de las perlas del efluente (Volesky, 1990).

2.7 Biorreactor PFTR

El reactor flujo pistón o PFTR (Plug- Flow Tubular Reactor), tienen una amplia aplicación en la industria, son una alternativa a la operación de mezcla perfecta para los reactores continuos. Los reactores flujo pistón pueden operar de manera vertical y horizontal, también estos pueden contener o no células inmovilizadas, al contener estas células son conocidas como reactores del lecho empacado (PFTR).

Este reactor se construye a menudo en muchos tubos de pequeños diámetros y de grandes longitudes y se emplean con fluidos a grandes velocidades y pequeños tiempos espaciales. Esto minimiza el mezclado axial del fluido, limita los perfiles radiales de temperatura y provee el área de transferencia de calor necesaria. Los tubos se arreglan en un banco como en los intercambiadores de calor. Si no se desea intercambio calórico en la zona de reacción, puede utilizarse uno o una serie de lechos empacados de diámetros más grandes, (Citado: Almaguer, Vesilind y Morgan, et, al., 2004).

Figura 15. Representación esquemática del diferencial de volumen en un reactor tubular flujo pistón.



Fuente: Academia.

Se observa un tubo donde se realiza una reacción con cambios en la concentración, la presión, la temperatura y la dirección axial, para la construcción de un PFTR.

Para la aplicación de un PFTR que varía con la posición, se tiene que aplicar el balance de materia utilizando diferentes volúmenes de reactor (figura 15), ecuación 1(16).

$$F_A - (F_A + dF_A) - (-R_A)dV = 0 \quad (1)$$

La ecuación 2 (17), es la utilizada para el diseño de un PFTR, en donde:

$$\frac{V}{F_{A0}} = \int_0^{X_A} \frac{dX_A}{(-R_A)} \quad (2)$$

Para el uso del PFTR, se debe de conocer su tiempo de residencia hidráulica (TRH), el cual es el tiempo en el que el flujo se encuentra en contacto con los pellets. Para poder obtener el valor de TRH, se debe de conocer el volumen del tubo interno del biorreactor y el flujo con el que se encuentra ingresando el efluente, se puede utilizar ecuación 7:

$$TRH = \frac{\text{VolumenPFTR}}{\text{Flujo}} \quad (7)$$

Para el uso de reactores biológicos con lechos empaquetados, se necesita representar el espacio hueco (ϵ) que debe de poseer que es para el paso único del flujo líquido, mientras el

espacio ocupado (ψ) representa el lugar ocupado por la matriz sólida. Ambos espacios representan el volúmen total del biorreactor, se puede utilizar ecuación 8:

$$\varepsilon + \psi = 1 \quad (8)$$

Después de haber determinado los valores del volúmen hueco y el volúmen ocupado, se puede determinar el volumen necesario de pellets para poder colocarlo en el interior del biorreactor. Utilizando la ecuación 11:

$$\text{volúmen hueco} = \text{volúmen total} - \text{volúmen pellets} \quad (11)$$

Con estos datos, se puede definir los valores de ε y ψ , teniendo en cuenta que el espacio hueco ocupe un porcentaje de 10-20% en relación con el volumen total y el espacio ocupado posea un porcentaje del 40%.

El flujo se determinara midiendo el tiempo que demora en llenar una probeta, siendo controlada por un cronometro.

2.7.1 Características del PFTR

Las características que presentan este tipo de reactores son las siguientes:

- Las reacciones químicas que se desarrollan en el sistema.
- Todos los reactivos se introducen continuamente y los productos se extraen en forma continua.
- Operan en régimen estable.
- La temperatura, la presión y la composición varían con relación a la longitud del reactor.

2.8 Plasma acoplado por inducción-Espectrometría de emisión atómica- (ICP-AES)

La ICP-AES es conocida como una técnica múltiplemente que permite el análisis simultáneo de un gran número de elementos y en niveles tan bajos como 1-10 ppm o ppb, (Vandecasteele, Block, 1993).

Los ICP-AES presentan como principales componentes la antorcha plasmática, el nebulizador y el policromador.

- La antorcha: Está conformada de tres tubos concéntricos de cuarzo que se encuentran rodeados por una bobina de inducción enfriada por agua que se encuentra conectada a un generador de alta frecuencia.
- El nebulizador sirve para la introducción de la muestra utilizando como transportador el Ar, existen diferentes tipos de nebulizadores como: el concéntrico, Babington, el de flujo cruzado y el ultrasónico estos serán escogidos dependiendo de su eficiencia, tolerancia a altas cargas de sales y estabilidad.
- El policromador sirve para separar las líneas espectrales para los diferentes elementos. Pueden distinguirse dos tipos de instrumentos de ICP-AES:
 - Los espectrómetros de lectura directa que poseen varias ranuras de detección prealineadas que permiten la detección simultánea de todos los elementos de interés. En este diseño, las líneas analíticas, por ejemplo el tipo de elementos medidos, no pueden cambiarse con facilidad.
 - Los espectrómetros secuenciales más flexibles que utilizan sólo un canal. Los diferentes elementos son detectados secuencialmente al rotar el monocromador, lo que obviamente ocupa mucho más tiempo que el enfoque simultáneo, (Varian, 2001).

El ICP funciona usando un plasma de argón en el que se inyecta una muestra líquida atomizada. El argón necesita que los niveles de oxígeno y de agua sean bajos, ya que presenta un efecto de apantallamiento sobre la señal de algunos metales que se encuentran en bajas cantidades. La muestra debe de ser ionizada en el plasma hasta alcanzar una temperatura de

5500-8000 K, esto provocara una vaporización casi completa del analito y a una alta eficiencia de atomización, introduciendo al nebulizador la solución de la muestra dentro de la antorcha con un flujo transportador de AR (1 l/min) y los iones emiten luz a diferentes longitudes de onda características que posteriormente se miden, (Vandecasteele, Block, 1993).

Para la determinación simultánea de varios elementos, debe establecerse un compromiso en las condiciones de la fuente a fin de obtener una respuesta máxima y una buena linealidad. ICP tiene un rango dinámico lineal de tres a seis órdenes de magnitud, permitiendo la determinación de un amplio rango de concentraciones sin dilución o pre concentración. Los límites de detección para la ICP-EAS están aproximadamente en el mismo rango que para la FAAS.

El método también tiene sus desventajas. El espectro de emisión de ICP puede ser complejo y por lo tanto, ocurren frecuentemente interferencias espectrales de los elementos de la matriz, de especies moleculares o del gas argón. Otra desventaja se encuentra en el alto costo del sistema y del funcionamiento de éste debido al alto consumo de Ar, (Vandecasteele, Block, 1993).

Figura 18. Foto de un ICP-AES; Modelo, óptima DV4300.



Fuente: Perkin Elmer, Inc.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

Para el desarrollo de la investigación se realizó el aislamiento e identificación de un consorcio nativo extraído de una muestra de efluentes de agua residual industrial (metal-mecánico), para evaluar su efectividad en la remoción de metales pesados encontrados en este efluente, utilizando un biorreactor PFTR.

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en la “Universidad Católica de Santa María”. En el laboratorio 302 del pabellón “H”.

3.2 Lugar de obtención de la muestra.

La muestra se obtuvo de la industria de rubro metal-mecánica, localizada en el distrito de Mariano Melgar, Arequipa.

3.3 Materiales

Para la ejecución del proyecto se utilizó material químico, equipos, entre otros que se detallaran más adelante.

3.3.1 Equipos

- Autoclave. Tuttnauer 1730M.
- Balanza analítica. Ohaus Pioneer.
- Bombas peristálticas. Bioflo 3000.
- Bomba al vacío. Vaccu Brandme-2.
- Espectrofotómetro. Shimazu 160-A.
- Estufa. JP Selecta 2000210.
- Incubadora. JP Selecta 2000210.
- Medidor de OD. SM 600.
- Multiparametro. YSI 63.
- Turbidímetro. TURB 355 T.
- Microscopio.
- Micropipeta.
- Cámara de neuvawer.
- Biorreactor.

3.3.2 Material de vidrio.

- Baguetas
- Beakers: 50ml, 250ml y 1000ml.
- Cubreobjetos: 18*18 mm
- Laminas Portaobjeto.
- Matraz Erlenmeyer: 250ml, 500 ml, 1000ml.
- Pipeta: 1 ml, 5 ml, 10ml.
- Placas Petri: 100*15 mm
- Probeta: 100 ml, 250ml.
- Tubos de ensayo: 13*100 ml.
- Varillas huecas de vidrio: 0.5 cm y 0.1 cm de diámetro.

3.3.3 Medios de Cultivo.

- Kligler Hierro Agar.
- TSI Agar.
- Lisina Hierro Agar.
- SIM.
- Urea.
- Simmons Citrato Agar.
- Mac Conkey Agar.

3.3.4 Reactivos Químicos.

- Cloruro de Potasio.
- Cloruro de Sodio.
- Sulfato de Magnesio heptahidratado.
- Fosfato diácido de Potasio.
- Nitrato de amonio.
- Fosfato ácido dipotásico.
- Sulfato de Magnesio.
- Sulfato diamónico.
- Etanol.
- Extracto de Levadura.
- Agar.
- Cloranfenicol.
- Dextrosa.
- Alginato de Sodio.
- Glicerol al 10%.
- Hidróxido de Potasio.
- Reactivo de Kovacs.
- Rojo de metilo.
- Cloruro de Calcio.
- Cristal violeta.
- Lugol.

- Acetona.
- Fucsina.

3.3.5 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por lo aislado de las muestras de los efluentes de la industria, metal–mecánicos.

3.3.6 Otros materiales

- Algodón medicinal.
- Asa de Kolle.
- Tijeras.
- Mangueras.
- Pernos de ¼ pulg.
- Tapones de jebe.
- Vidrio.
- Papel aluminio.
- Papel filtro.
- Recipientes de vidrio 1000 ml.
- Termostato.
- Tubos eppendorf.
- Jeringa hipodérmica: 1ml y 5 ml.
- Mariposas y uniones de ¼ pulg.
- Encendedor.
- Propipeta

3.4 Metodología

3.4.1 Toma de muestra

Se tomó la muestra del efluente de la industria metal-mecánica, del pozo de almacenamiento de la empresa, las cuales fueron debidamente colectadas en frascos oscuros estériles, después los dos frascos colectados se colocaron en un contenedor para su transporte a la “Universidad Católica de Santa María”.

Luego se realizó la caracterización fisicoquímica de la muestra, la caracterización del DQO, DBO₅ y Concentración de metales (ICP) no se realizó debido a que fueron entregados por la empresa, seguidamente con el frasco no entregado se realizó la caracterización de la muestra:

- Aceites y Grasas: Se tomó 150 ml. de la muestra y se llevó al laboratorio de control de calidad antes de las 12 h. donde realizaron el ensayo.
- pH, Temperatura, Turbidímetro y conductividad: Se tomaron los datos in- situ, con la utilización de los equipos YSI 63 y TURB 355T, que fueron debidamente calibrados antes de su utilización.
- Sólidos Suspendidos Totales: Se colocó el papel filtro en un embudo y este se llevó a un matraz, en el cual se le agregó poco a poco 700 ml del efluente industrial, seguidamente se lavó 3 veces con 20 ml agua destilada, luego de que ya no había trazas se removió el embudo y se descartó el filtrado, y los filtros se colocaron en una luna de reloj, se introdujo al horno de secado 105 °C por una hora, finalmente se colocó al desecador por 1 hora y se pesó.

3.4.2 Aislamiento bacteriano

Se preparó dos medios de cultivo para el aislamiento de los microorganismos, uno de ellos fue el de Medio mínimo de Goldman y el otro fue PDA (ANEXO 3) ambos a un pH 4.

Con ayuda de un asa de Kolle se sembró la muestra del efluente industrial en los medios de cultivo utilizando el método de estría o agotamiento. Realizando tres repeticiones de sembrado por cada uno de los cultivos.

Las placas sembradas se llevaron a la incubadora a 37 °C por un tiempo de 96 horas.

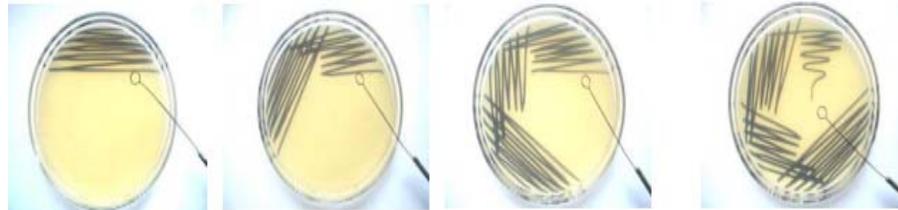
Procedimiento del método de agotamiento (figura 19)

- Esterilizar el asa de Kolle por flameado directo.
- Obtener la muestra con asa y suspenderla en un extremo de la placa de agar, haciendo estrías (líneas) de un extremo a otro (primer cuadrante).
- Flamear el asa, enfriar en el extremo e iniciar estrías desde el cuadrante primero y extenderlas hasta el cuadrante dos.
- Flamear el asa, enfriar en el extremo e iniciar estrías desde el cuadrante dos y extenderlas hasta el cuadrante tres.

- Flamear el asa, enfriar en el extremo e iniciar estrías desde el cuadrante tres y extenderlas hasta el cuadrante cuatro.

Esos pasos se realizan en ambos medios de cultivo.

Figura 19. Pasos de siembra por agotamiento



Fuente: Guía microbiológica.

3.4.2.1 Caracterización microscópica

Luego de las 96 h. de incubación se realizó la caracterización microscópica, de las colonias obtenidas en la placa que tenía el Medio mínimo de Goldman se realizó la tinción de Gram (Christian GRAM, 1884), la cual para lograr una adecuada tinción se colocó una gota de agua estéril en una lámina portaobjetos y con ayuda de un asa de Kolle desprendemos en la placa una pequeña porción de la colonia y la disipamos sobre la gota de agua para que esta no se note muy cargada en el microscopio, seguidamente lo dejamos fijar a temperatura ambiente, primero se le agrega el cristal violeta lo dejamos actuar por un minuto y luego lo enjuagamos con agua destilada, después agregamos lugol, también se dejara actuar por un minuto y volvemos enjuagar con agua destilada, seguido agregamos el alcohol acetona para la decoloración y lo dejamos actuar por 30 segundos, enjuagamos nuevamente con agua destilada y adicionamos safranina que tiene como función actuar como colorante de contraste, se deja actuar por un minuto, después enjuagamos la muestra con agua destilada y esperamos que lamina portaobjetos seque y la observamos al microscopio.

3.4.3 Formación de consorcio

3.4.3.1 Purificación de cepas

Se preparó dos medios de cultivo para la selección de bacterias uno fue el Medio mínimo de Goldman y el otro será el medio de Agar MacConkey. Seguidamente se sembraron con la ayuda de un asa de Kolle se sembró por el método de estría y se replicó unas 10 veces, hasta poder purificar las cepas bacterianas.

3.4.3.2 Selección de cepas con mejor biorremoción

Para la selección de las cepas bacterianas obtenidas se realizó el siguiente procedimiento:

- Se preparó 100 ml de medio nutritivo enriquecido con 250 ml del efluente, se llevó a auto clavar por 15 min. a 120 °C.
- Se dejó enfriar y se repartió 15 ml en 24 tubos de ensayo (20 x 150 mm), para formar 3 baterías cada una conteniendo 8 tubos de ensayo.
- Se inoculo un tubo con 1 ml. de la cepa 1, se realizó el mismo proceso con los otros tubos sobrantes de la batería, solo que con cepas del 2 al 7 y uno de los tubos se tomó como blanco, en la otra batería sobrante se realizó el mismo proceso para tener una comparación.
- Se llevaron a incubación ambas baterías de tubos por un periodo de 10 días.
- Luego se tomó 5 ml y se llevó a centrifugar por 10 minutos a 5000 rpm.
- Finalmente se tomó 1.5 ml de cada uno de los tubos y se llevó a espectrofotómetro a una longitud de 570 nm.

3.4.4 Caracterización microbiológica

Luego de haber seleccionado las cepas se realizó la caracterización macroscópica donde se observó que tipo de colonias creció y que aspecto tenían, también se hizo la caracterización microscópica, se realizó la tinción de Gram (Christian GRAM, 1884), la cual para lograr una adecuada tinción se colocó una gota de agua estéril en una lámina portaobjetos y con ayuda de un asa de Kolle desprendemos en la placa una pequeña porción de la colonia y la disipamos sobre la gota de agua para que esta no se note muy cargada en el microscopio, seguidamente lo dejamos fijar a temperatura ambiente, y se realizó el mismo procedimiento con la tinción de GRAM que en el punto 3.4.2.1 y finalmente se llevó al microscopio a 100x.

3.4.4.1 Identificación bioquímica

Para la identificación bioquímica de las bacterias se realizó de la siguiente manera:

- **Prueba de TSI (Triple Sugar Iron).**

Esta prueba es utilizada para la fermentación de la glucosa, lactosa, sacarosa, la producción de H₂S y la producción de gas. Se preparó 30 ml de medio TSI donde se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta su disolución, luego se separó en 6 tubos de ensayo colocando 5 ml en cada uno. Y se llevó a la autoclave a 121 °C por 15 minutos, Luego se dejó enfriar en posición de medio fondo. Finalmente se inocularon por el método de picadura todos los tubos con las tres bacterias por duplicado y se incubaron por 24h.

- **Prueba de LIA (Agar Lisina Hierro).**

Esta prueba sirve para demostrar la producción de dos enzimas: la lisina descarboxilasa y la lisina desaminasa y detectar la producción de H₂S. Se preparó 30 ml de medio LIA donde se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta su disolución, luego se separó en 6 tubos de ensayo colocando 5 ml en cada uno. Y se llevó a la autoclave a 121 °C por 15 minutos, Luego se dejó enfriar en posición de medio fondo. Finalmente se inocularon por el método de picadura todos los tubos con las tres bacterias por duplicado y se incubaron por 24h.

- **Prueba de SIM**

Esta prueba nos permite identificar la formación de sulfuro, la producción de indol y la motilidad. Se preparó 30 ml de medio, donde se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta su disolución, luego se separó en 6 tubos de ensayo colocando 5 ml en cada uno. Y se llevó a la autoclave a 121 °C por 15 minutos, Luego se dejó enfriar Finalmente se inocularon por el método de picadura todos los tubos con las tres bacterias por duplicado y se incubaron por 24h.

- **Prueba de Ureasa**

Esta prueba nos indica si el microorganismo tiene la capacidad de hidrolizar la urea. Se preparó 30 ml de medio, donde se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta su disolución, luego se separó en 6 tubos de ensayo colocando 5 ml en cada uno. Y se llevó a la autoclave a 121 °C por 15 minutos, Luego se dejó enfriar Finalmente se inocularon por el método de picadura todos los tubos con las tres bacterias por duplicado y se incubaron por 24h.

- **Prueba de Citrato**

Esta prueba nos indicara si el microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno, provocando alcalinización del medio. Se preparó 30 ml de medio, donde se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta su disolución, luego se separó en 6 tubos de ensayo colocando 5 ml en cada uno. Y se llevó a la autoclave a 121 °C por 15 minutos, Luego se dejó enfriar Finalmente se inocularon por el método de picadura todos los tubos con las tres bacterias por duplicado y se incubaron por 24h.

- **Mac Conkey**

Agar selectivo y diferencial para el aislamiento de Enterobacterias. El medio contiene sales biliares y cristal violeta que son inhibidores de Gram positiva Se preparó 30 ml de medio, donde se llevó a baño maría, se calentó y se fue agitando hasta su disolución, luego se separó en 6 tubos de ensayo colocando 5 ml en cada uno. Y se llevó a la autoclave a 121 °C por 15 minutos, Luego se dejó enfriar Finalmente se inocularon por el método de picadura todos los tubos con las tres bacterias por duplicado y se incubaron por 24h.

- **Catalasa**

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno. Con un asa, se transfirió parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos, se agregó 1 gota de Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) al 3% y observar la producción de burbujas.

- **Oxidasa**

El sistema citocromo se encuentra en los organismos aerobios o anaerobios facultativos, de modo que la prueba de Oxidasa es importante para identificar aquellos organismos que carecen de esta enzima (anaerobios obligados). Se cortó pequeños trozos de papel filtro, se colocó sobre las colonias, luego se retiró y se le agrego el reactivo de oxidasa y se esperó alrededor de 10 segundos para tener los resultados.

3.4.5 Cinética bacteriana

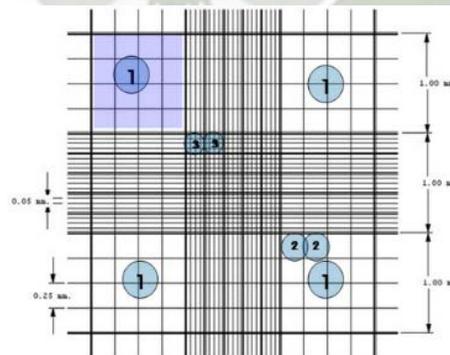
3.4.5.1 Curvas de crecimiento

Se preparó tres matraces de 500 ml, con el medio mínimo de Goldman (Anexo 3), y se llevó a la autoclave por 15 min. a 120 °C. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente, seguidamente se procedió a inocular con 1 ml de cada una de las cepas en cada uno de los matraces, que anteriormente fueron etiquetados y posteriormente se procedió a llevar los matraces al shaker donde se mantuvo las muestras a 30 °C en movimiento constante.

Primero se tomó un blanco como control, luego se tomó una alícuota de 1.5 ml que se colocaron en tubos eppendorf, cada alícuota fue tomada en un periodo de tiempo al inicio de cada dos horas y fue aumentando hasta cada seis horas hasta concluir las 96 h de incubación.

Segundo se lavó cuidadosamente la cámara de Neubauer sin frotar la zona brillante del centro y se secó con papel suave. Seguidamente se homogenizó la muestra e inmediatamente se tomó unos 10 μ l. de la muestra con ayuda de una micropipeta y se colocó entre la cámara y el cubreobjeto por el borde de la cámara, algunas de las muestras se diluyeron debido a su alta concentración de células. Se dejó que la muestra se distribuyera por capilaridad. Luego se dejó reposar por aproximadamente 5 min, y la cámara de Neubauer se llevó al microscopio y se localizó la zona cuadrículada con el objetivo de 10X. Posteriormente se localizó el (C3) (Imagen 2), que son los cuadros más pequeños que se encuentran divididos en 16 con el objetivo de 40X.

Figura 20. Cuadrados de la Cámara de Neubauer



Fuente: Celeromics.

Finalmente se realiza la cuantificación de las células, las únicas células que se contaron son aquellas que se encontraban dentro del rectángulo. Después de realizar el conteo se aplicó la fórmula ecuación 3 y ecuación 4, para obtener el número de células por mililitro presentes en el medio de cultivo, para luego poder realizar las curvas de crecimiento. El experimento fue realizado por triplicado. (21)

$$N = NCC * 25 * 10 * 1000 \quad (3)$$

Dónde:

N: Número de células por mililitro.

NCC: Número de células promedio contadas en la Cámara de Neubauer.

25: Numero de cuadrados presentes en el cuadrante de conteo.

10: Factor de corrección para llevar la cuenta a 1 ml³.

1000: Factor de corrección para llevar la cuenta de 1 ml.

(22)

$$N = NCC * 25 * 10 * 1000 * FD \quad (4)$$

Dónde:

N: Número de células por mililitro.

NCC: Número de células promedio contadas en la Cámara de Neubauer.

25: Numero de cuadrados presentes en el cuadrante de conteo.

10: Factor de corrección para llevar la cuenta a 1 ml³.

1000: Factor de corrección para llevar la cuenta de 1 ml.

FD: Factor de dilución.

3.4.5.2 Curva de crecimiento del consorcio

Se preparó 100 ml. de medio mínimo de Goldman (Anexo 3), se llevó a la autoclave por 15 min. a 120 °C, se dejó enfriar y de ahí se le agregó 50 µl de las tres cepas seleccionadas, se incubó por 2 días.

Luego se preparó 1000 ml. de medio mínimo de Goldman y se llevó a la autoclave por 15 min. a 120 °C, se dejó enfriar y de ahí se le agregó 1 ml del cultivo anterior, y posteriormente se procedió a llevar los matraces al shaker, donde se mantuvo las muestras a 30 °C y en movimiento constante.

Seguidamente se tomó una alícuota de 1.5 ml que se colocaron en tubos eppendorf, cada alícuota fue tomada en un periodo de tiempo al inicio de cada dos horas y fue aumentando hasta cada seis horas hasta concluir las 144 h de incubación.

Segundo se lavó cuidadosamente la cámara de Neubauer sin frotar la zona brillante del centro y se secó con papel suave. Seguidamente se homogenizó la muestra e inmediatamente se tomó unos 10 µl de la muestra y se diluyó 1:20, 1:30 dependiendo de la muestra a contar este procedimiento se realizó con ayuda de una micropipeta y luego esta muestra diluida se colocó entre la cámara y el cubreobjeto por el borde de la cámara, se dejó que la muestra se distribuyera por capilaridad. Luego se dejó reposar por aproximadamente 5 min, y la cámara de Neubauer se llevó al microscopio.

Finalmente se realiza la cuantificación de las células, se realizó el conteo se aplicó la fórmula (ecuación 4), para obtener el número de células por mililitro presentes en el medio de cultivo, para luego poder realizar las curvas de crecimiento.

3.4.5.3 Crecimiento bacteriano con variación de temperatura

Se preparó 50 ml de agar nutritivo y se le agregó 115 ml de efluente industrial, luego se repartió 15 ml en 11 tubos de ensayo (20 x 150 mm.), y se llevó a autoclavar por 15 min. a 120 °C, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inoculó con 1 ml. del consorcio excepto un tubo que se tomó como blanco, luego se incubó a las siguientes temperaturas: 20; 22; 24; 26; 28; 30; 32; 34; 36 °C por un tiempo de 5 días. Concluido este tiempo se obtuvo la

concentración bacteriana mediante el método de espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm. El experimento fue realizado por triplicado.

3.4.5.4 Crecimiento bacteriano con variación de pH

Se preparó 20 ml de agar nutritivo y se le agregó 55 ml de efluente industrial, luego se repartió 15 ml en 5 tubos de ensayo (20 x 150 mm), después se procedió a variar el pH con la utilización de ácido clorhídrico en un rango que va de 2 a 5 y se llevó a autoclavar por 15 min. a 120 °C, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inoculó con 1 ml. del consorcio excepto un tubo que se tomó como blanco, se incubó a temperatura ambiente por un tiempo de 5 días. Concluido este tiempo se obtuvo la concentración bacteriana mediante el método de espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm. El experimento fue realizado por triplicado.

3.4.6 Inmovilización celular usando alginato de calcio

3.4.6.1 Preparación de inóculo

Se preparó 1000 ml de medio de cultivo nutritivo, y se llevó a autoclavar por 15 min. a 120 °C, luego se dejó enfriar y se inoculó con 3 ml. del cultivo del consorcio, finalmente se llevó a incubar a 30 °C por un tiempo de 72h.

3.4.6.2 Entrampamiento de células

Se disolvió 9 g de alginato en 300 ml de medio de crecimiento. Se mezcló hasta que todo el alginato se disolvió por completo. La solución final contiene un 3% en peso de alginato.

Primero se dejó caer gota a gota con la ayuda de una jeringa hipodérmica sobre 200 ml. de una solución gelificante de CaCl_2 (2%) (Figura 23). Se obtuvieron perlas de alginato relativamente pequeñas para reducir al mínimo la resistencia de transferencia de masa, con un diámetro de 0,5 a 2 mm. Finalmente los pellets encapsulados se mantuvieron en la solución de CaCl_2 (2%) durante 24 horas para dar mejor consistencia a las esferas de alginato y luego se lavó con agua destilada.

Figura 23. Inmovilización celular, metodología de trabajo.



Fuente: García Rivero.

3.4.7 Estudio del proceso de biosorción

Se realizó dos tipos de métodos para el estudio del proceso de biosorción los cuales se describirán a continuación:

3.4.7.1 Método de biosorción por lotes

Se utilizó las células inmovilizadas anteriormente, estas se suspendieron en un matraz de 500 ml que contenía los efluentes industriales, y se llevó a un agitador con una temperatura de 27 °C a 150 rpm por un tiempo de 10 días. Se detuvo el proceso y se separó el efluente de los pellets y este se llevó al IPC, el experimento se realizó por duplicado. La eficiencia de biosorción se determinara en función del % de remoción ecuación 5, (24):

$$\%remocion = \frac{Co-Cf}{Co} \times 100 \quad (5)$$

Datos:

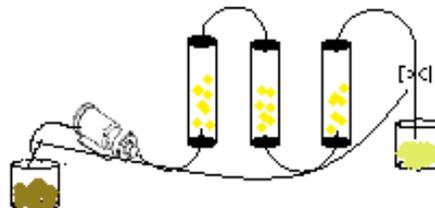
C_o: Concentración inicial.

C_f: Concentración final.

3.4.7.2 Método de biosorción por columna.

Las pruebas se llevaron a cabo en tres columnas de 1.6 cm de diámetro por 14 cm de altura, las tres columnas se colocaron en serie. Se empacaron con pellets en un 70%. El sistema se alimentó con 250 ml del efluente de manera ascendente con un flujo de 0.123 ml/s con la ayuda de una bomba peristáltica, por un tiempo de 10 días, finalizado el tiempo se recolecto la muestra y se midió la concentración final de los metales pesados por la técnica de IPC. Para la determinación de los parámetros finales se utilizó la ecuación 5.

Figura 25. Método de columna



Fuente: Elaboración propia.

3.4.8 Conformación de un biorreactor PFTR

La ecuación de diseño que se utilizó para poder determinar las dimensiones del PFTR, ecuación 6 (26).

$$-F \frac{dC_s}{dz} = (1 - \varepsilon) \frac{q_p X}{Y_{p/s}} A \quad (6)$$

Dónde:

F: flujo Volumétrico

Cs: Concentración de sustrato a convertir.

Z: Posición.

q_p: Velocidad específica (masa producto/masa celular*tiempo).

X: concentración celular promedio por unidad de volumen.

Y_{p/s}: Coeficiente estequiométrico.

A: área normal de flujo.

Otras ecuaciones que se tomó en cuenta fueron las siguientes:

El valor de TRH, se obtuvo de conocer el volumen del tubo interno del biorreactor y el flujo con el que se encuentra ingresando el efluente, se puede utilizar la ecuación 7, (27).

$$TRH = \frac{\text{VolumenPFTR}}{\text{Flujo}} \quad (7)$$

Se representó el espacio hueco (ε) que debe de poseer que es para el paso único del flujo líquido, mientras el espacio ocupado (ψ) representa el lugar ocupado por la matriz sólida. Ambos espacios representan el volúmen total del biorreactor, se puede utilizar la siguiente Ecuación 8.

(28)

$$\varepsilon + \psi = 1 \quad (8)$$

(29)

$$\varepsilon = \text{Volúmen hueco} / \text{Volúmen total}. \quad (9)$$

(30)

$$\psi = \text{Volúmen ocupado} / \text{Volúmen total}. \quad (10)$$

Se determinó los valores del volúmen hueco y el volúmen ocupado, se puede determinar el volumen necesario de pellets para poder colocarlo en el interior del biorreactor. Utilizando la ecuación 11 para determinar el volúmen hueco. (31).

$$\text{volúmen hueco} = \text{volúmen total} - \text{volúmen pellets} \quad (11)$$

Luego utilizando el programa de AUTOCAD 2013, se procedió a dibujar el biorreactor tanto en un plano 2 D donde se encontraran definidas las dimensiones del biorreactor, se dibujó también un esbozo en 3D para el sistema de degradación de efluentes metal-mecánica.

Después se procedió a la construcción del biorreactor. Primero se compró una plancha de acero inoxidable de $\frac{1}{2}$ pulgada, la cual servirá para hacer el enchaquetado de 28 cm de diámetro por 40 centímetros de altura, este enchaquetado tendrá ocho cortes ovalados de 5 cm de ancho por 28 cm de altura, y en el interior se encontrara 16 agarradores ajustables de acero inoxidable, los cortes fueron tapados con vidrio resistente al calor, aparte se adquirió un tubo de pírex resistente al calor, de 4 cm de diámetro por 1,50 de altura, estos se cortaron en 8 tubos pequeños de 4 cm de diámetro por 20 cm de altura.

Los dos PFTR se montaron en el laboratorio H- 301, el cual consta de un enchaquetado, en la parte inferior tiene una resistencia que se encuentra equipado con un controlador de temperatura que fue configurado para que trabaje en un rango de 25 °C a 27 °C, también se instaló el medidor de nivel y las mangueras $\frac{1}{2}$ pulgada de salida y entrada. Por otro lado se colocó los 4 tubos dentro del enchaquetado, en la parte inferior de estos se instaló una rejilla de 1 mm acero inoxidable y luego un tapón N °8, lo mismo se realizó en la parte superior

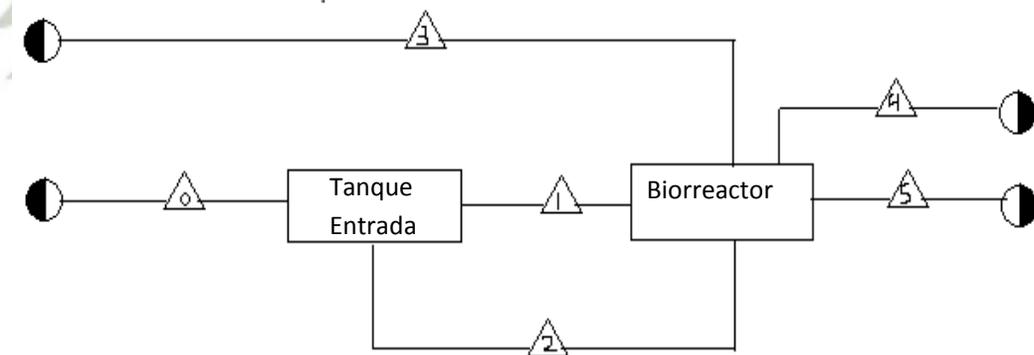
del tubo, finalmente se instalaron los codos de vidrio de ½ pulgada y las mangueras de ½ pulgada que unirán los tubos.

El reactor ensamblado fue llenado con agua en el interior del enchaquetado para la transferencia de calor, y los tubos de vidrio se fueron llenando con 1200 ml del efluente industrial con un flujo de 0.15 ml/s, utilizando una bomba, dentro de cada tubo de pírex se empaquetó con un 70% de pellets, este proceso se mantuvo un tiempo de 3 semanas en recirculación, al final de ese tiempo se procedió a tomar la muestra final y se llevó a leer el resultado en el ICP, el cual se comparó con los parámetros iniciales que se tiene de metales totales para observar si hubo algún tipo de remoción de estos en el efluente industrial (ecuación 5).

- **Esquema de PFTR**

Se realizó un diagrama del sistema de tratamiento de aguas residuales de industria metal-mecánica, indicándolas entradas y salidas de este proceso que tendrá, y se podrá realizar una tabla de información de las entradas y salidas.

Figura 32. Diagrama que indica las entradas y salidas del sistema PFTR



Fuente: Elaboración propia

Se observa en la Tabla 8, la descripción de las entradas y salidas en el proceso de tratamiento de aguas.

Tabla 8. Características del esquema de trabajo en el biorreactor PFTR.

FLUJO	TIPO DE FLUJO	TIPO DE FLUIDO
1	Entrada	Agua a tratar
2	Recirculación	Agua en Tratamiento
3	Entrada	Agua para enchaquetado
4	Salida	Agua tratada
5	Salida	Agua de enchaquetado

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 9, se describe las partes del PFTR, que en el interior constan de 4 cuerpos, en forma de cilindro y de material de vidrio, con la capacidad de tratamiento de 1000 ml-1500 ml, esta descripción es igual para ambos reactores construidos.

Tabla 9. Descripción de los elementos del PFTR.

CÓDIGO	FUNCIÓN	CARÁCTERÍSTICAS
E	Enchaquetado	Tiene una longitud de 28 x 40 cm. Se encuentran los 4 reactores dentro de este, sirve para proveer calor al proceso.
C1	Primer cuerpo	Longitud de 20 cm de altura. Longitud de 4 cm de diámetro. Capacidad de 250 ml.
C2	Segundo Cuerpo	Longitud de 20 cm de altura. Longitud de 4 cm de diámetro. Capacidad de 250 ml.
C3	Tercer Cuerpo	Longitud de 20 cm de altura. Longitud de 4 cm de diámetro. Capacidad de 250 ml.
C4	Cuarto Cuerpo	Longitud de 20 cm de altura. Longitud de 4 cm de diámetro. Capacidad de 250 ml.

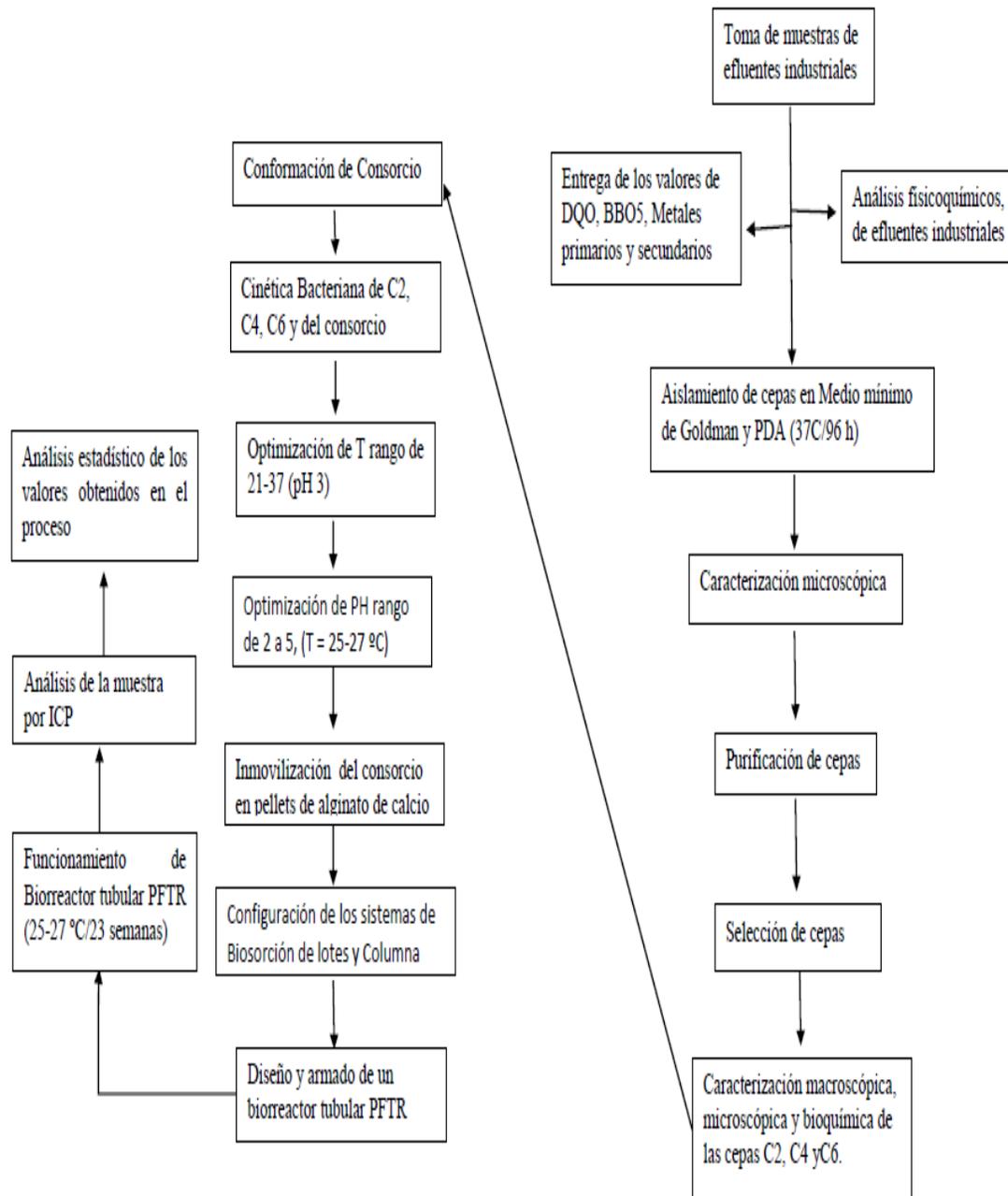
Fuente: Elaboración propia

3.4.9 Análisis estadístico de los resultados

Se realizó el análisis descriptivo mediante el test de ANOVA utilizando el programa de Excel versión 2013, que nos permitió comparar simultáneamente los datos experimentales obtenidos de la remoción de metales totales, en la evaluación de ambos métodos de biosorción y la evaluación del funcionamiento del PFTR.



3.5 Flujoograma



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

En los resultados obtenidos se evidencia el comportamiento del consorcio, frente a la capacidad de crecimiento que esta tiene en presencia a diferentes pH y temperaturas, también se realizó un comparativo entre ambos métodos de biosorción para tomar en cuenta en cual se obtuvo un mayor rango de sorción de metales, después se diseñó, conformo y construyo un PFTR. Finalmente se realizó el análisis.

4.1 Caracterización del efluente a tratar

Luego de haber realizado la recolección del efluente industrial metal-mecánico a tratar, se procedió a realizar la caracterización de algunos parámetros de la muestra, la toma de la muestra se realizó con los materiales de protección adecuados, en la misma empresa se tomó parámetros de campo como pH (ysi 63), Temperatura (ysi 63), Conductividad (ysi 63), turbidez (TURB 355 T), olor y color, como indica “DIGESA” como requisito para la toma de muestras de agua y su manipulación, se observa a simple vista que la muestra presenta aceites y grasas debido a las actividades que se realizan en la empresa y el tipo de detergentes utilizado para el lavado de piezas y equipos, también presenta un olor peculiar como un conjunto de hidrocarburos.

Los parámetros de DBO, DQO y ICP para metales pesados fueron entregados por la empresa, el estudio realizado en el laboratorio fue el de solidos suspendidos y el análisis de

Aceites y Grasas fue realizado por el laboratorio de control de calidad de la “Universidad Católica de Santa María”. En la tabla 10 y tabla 11, se detallan los resultados obtenidos de los parámetros analizados.

Tabla 10. Componentes del agua residual industrial.

PARÁMETROS	UNIDAD	EXPRESIÓN	RESULTADO
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	DQO	406
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	DBO5	193
Solidos Totales Suspendidos	mg/L	S.S.t.	629
Aceites y Grasas	mg/L	-	430
Temperatura	C	T	19.5
Conductividad	μs/m		0.904
pH		pH	3.5
Turbidez	ntu	-	2.41
Olor	-	-	Aroma un poco a petróleo
Color	-	-	Amarillo oscuro

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 11. Componentes de metales totales.

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO
Aluminio (Al)	mg/l	4.2950
Arsénico (As)	mg/l	0.1060
Bario (Ba)	mg/l	0.1560
Berilio (Be)	mg/l	0.0006
Cadmio (Cd)	mg/l	0.0621
Calcio (Ca)	mg/l	85.703
Cobalto (Co)	mg/l	0.0314
Cobre (Cu)	mg/l	32.421
Cromo (Cr)	mg/l	7.0801
Estaño (Sn)	mg/l	0.0181
Estroncio (Sr)	mg/l	0.6283
Fosforo (P)	mg/l	18.055
Hierro (Fe)	mg/l	8.8530
Magnesio (Mg)	mg/l	22.751
Manganeso (Mn)	mg/l	8.0321
Molibdeno (Mo)	mg/l	4.6800
Níquel (Ni)	mg/l	0.9021
Plata (Ag)	mg/l	0.0778
Plomo (Pb)	mg/l	0.7793
Potasio (K)	mg/l	24.013
Selenio (Se)	mg/l	0.0211
Silicio (Si)	mg/l	24.801
Sodio (Na)	mg/l	353.21
Vanadio (V)	mg/l	0.0151
Zinc (Zn)	mg/l	2.0121

Fuente: Elaboración propia.

Los datos obtenidos se encuentran fuera del rango con respecto a las V.M.A., para la descarga de estos al alcantarillo público, aparte de que no son reutilizables y por ende el costo del gasto de agua en la empresa es caro.

Como se observa en tabla N° 10 se puede decir que al pH al que se encuentran es un valor de 3.5, debido a todos los tipos de materiales que utilizan en el proceso y la producción de la empresa. Otro parámetro a observar es el de Aceites y grasas como sospechamos al principio este efluente sobrepasa los V.M.A., de este parámetro debido al área de pintado, limpieza de partes de equipo que reparan.

Finalmente se observó la Tabla N° 11, y se puede decir que este efluente contiene un gran número de metales, algunos de ellos se encuentran en bajas concentraciones adecuadas para el medio ambiente, pero en otros metales las concentraciones son altas, pudiendo provocar problemas con el medio ambiente si entran en contacto, ya que no son de fácil degradación; pudiendo provocar un problema en la salud debido a que en altas concentraciones son tóxicos no solo para humanos sino también para animales.

4.2 Aislamiento y caracterización del consorcio obtenido de una muestra de efluente residual

Después de haber sembrado el efluente de la industria metal-mecánica (17/06/14), en las placas de Medio mínimo de Goldman y PDA, y haberlo tenido en incubación por un periodo de 96 horas a 37 °C, se observó la muestra de colonias tal como se muestra en la figura 33.

Figura 33. A) CMI 1, B) CMI 2, C) CMI 3.

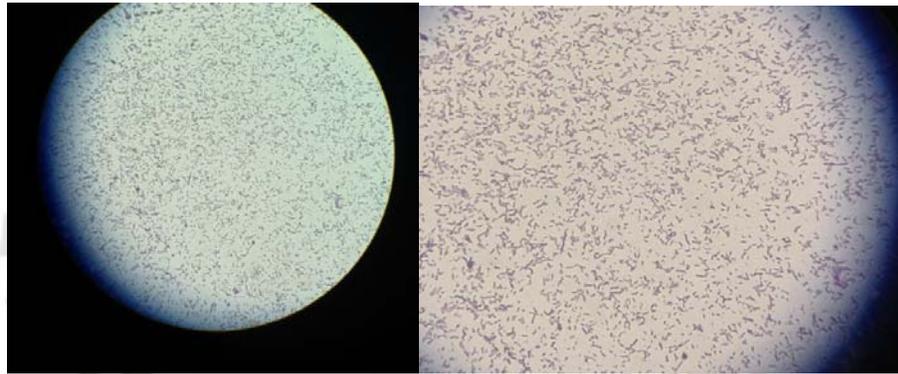


El Medio mínimo de Goldman es un medio mineral que es adecuado para el aislamiento de las cepas provenientes de efluentes residuales, debido a la composición que presenta este medio (pH 3). Se observaron diferentes colonias en las placas CMI 1 y CMI 2, encontrando diferentes poblaciones bacterianas, algunas eran rugosas, otras lisas y unas eran redondas

bien definidas, tienen colores entre cremas y blancos. En la placa CMI 3 no se observó ningún crecimiento de hongos o levaduras.

Luego se realizó la tinción de Gram a las colonias que se obtuvieron observando lo que se muestra en la figura 34:

Figura 34. Caracterización microscópica de las colonias aisladas, A) Foto a 40x. B) Foto a 100x.



En la figura 34, se observa en ambas fotos bastones, cocos y cadenas, de color rojo y moradas, indicándonos que lo único que creció son bacterias Gram + y Gram -, en ambas placas CMI 1 y CMI 2. Esto nos indica que solamente en esos efluentes existen cepas bacterianas.

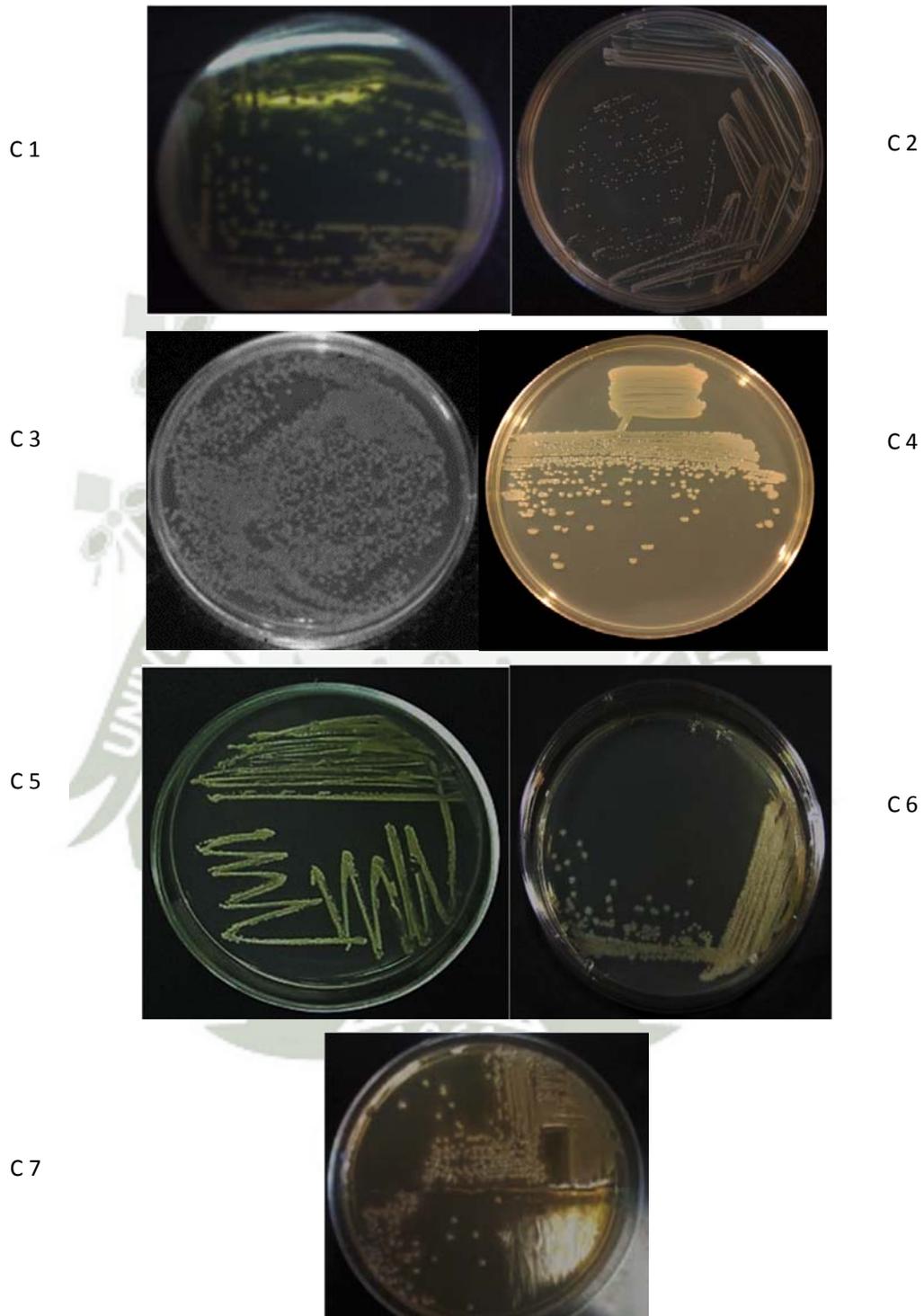
4.3 Conformación de consorcio

4.3.1 Purificación de las cepas.

La información de la caracterización parcial que se realizó al consorcio inicial nos indicó, que se debía de preparar dos tipos de medios uno para Gram negativo que fue el de MacConkey y otro para Gram positivo que fue el Medio mínimo de Goldman.

Después de haber preparado ambos medios se realizó el replicado 10 veces y separando y purificando las cepas obtenidas en el aislamiento de microorganismos que se realizó a la muestra, se obtuvo diferentes cepas bacterianas que fueron etiquetadas como: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7.

Figura 35. A) C1, B) C2, C) C3, D) C4, E) C5, F) C6, G) C7



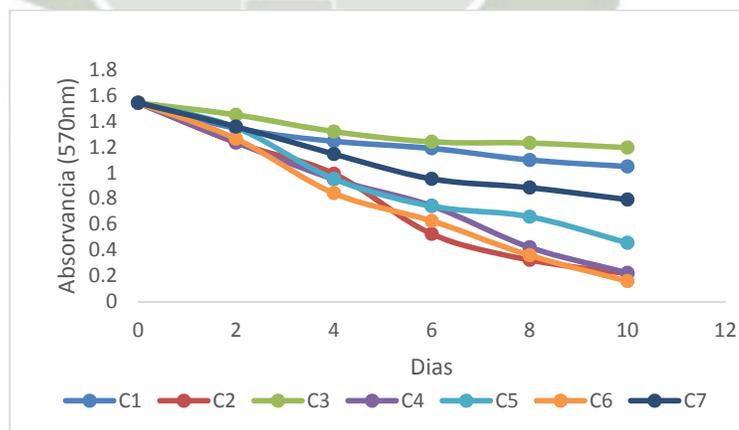
En la figura 35, se observa todas las cepas aisladas, en la C1 se pueden ver colonias redondas definidas de color amarillo, en la C2 se puede ver colonias lisas y redondas definidas de color crema, en la C3 se puede ver colonias mucosas y lisas de color crema, en la cepa C4 se observa colonias redondas definidas de color blanco cremoso, en la cepa C5 se puede observar colonias lisas de color amarillo verdoso, en la cepa C6 se observa colonias redondas regulares de color crema, y la cepa C7 se observa colonias redondas bien definidas y de color amarillo un poco brillante.

Se obtuvieron cepas sospechosas de ser, *bacillos*, *acinetobacter*, *Klebsiella*, *pseudomona*, *estreptococos*, debido al crecimiento observado en estas placas, pero aun así no se puede asegurar que esas son las cepas bacterianas encontradas ya que se le tendría que realizar una caracterización microbiológica.

4.3.2 Selección de cepas`

Después de un periodo de 10 días, donde se mantuvieron en incubación a 37 °C los 7 tipos de cepas obtenidas, al retirarlas de la incubadora se pudo observar a simple vista que las cepas C3 y C1, no fusionaron como se esperaba debido a que el color se mantuvo casi igual que cuando estos tubos se inocularon, pero para poder estar seguros de que cepas tienen una mejor resistencia al efluente, se tomó una alícuota de cada batería cada dos días y se llevó al a una longitud de onda de 570 nm. Obteniendo los siguientes resultados:

Figura 36. Grafica de disminución de remoción de metales por día.



Se puede decir después de observar la figura 36, que todas las cepas llegaron a disminuir la absorbancia, pero en el caso de la cepa C1 y C7 como se tenía esperado la disminución fue

mínima, lo que nos indica que no cumple con lo propuesto, las cepas C2, C4 y C6. Tienen una disminución mayor de la concentración en comparación con las otras cepas estudiadas, lo cual nos indica que estas remueven los metales encontrados en el efluente ya que se sabe que a menor concentración menor absorbancia.

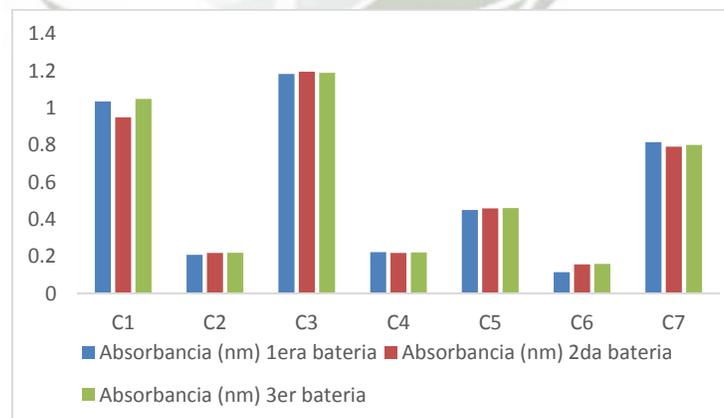
Tabla 12. Comparación de los resultados de espectrofotometría de los tres ensayos para la selección de cepas.

Cepa	ABSORBANCIA (570 nm)		
	1era Batería	2da Batería	3er Batería
C1	1.035	0.949	1.048
C2	0.208	0.219	0.22
C3	1.183	1.195	1.189
C4	0.223	0.219	0.221
C5	0.450	0.458	0.461
C6	0.115	0.157	0.16
C7	0.815	0.791	0.801

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 12 se observa los datos de los resultados de los tres ensayos realizados el último día, se puede decir que los valores obtenidos entre los tres no presentan mucha diferencia y esta tabla será la base para la gráfica de la figura 37.

Figura 37. Grafica comparativa entre las cepas bacterianas.



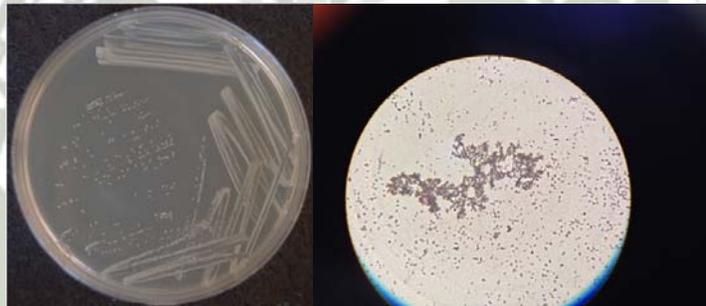
La figura 37, es una gráfica de comparación del día 10 entre las cepas y los tres ensayos realizados, que se obtuvieron del aislamiento de los efluentes industriales, con estos resultados se corroboró los resultados de la figura 36, con respecto a las cepas C2, C4 y C6, que presentan una menor absorción.

En otras palabras se puede decir que las cepas C2, C4 y C6, son de mayor resistencia a los metales. Algo semejante en obtener cepas nativas sucedió en los experimentos realizados por Kumar A. et. al., 2011 en el proceso de purificación y selección de las cepas resistentes a los metales.

4.4 Caracterización de cepas

Después de haber realizado la selección de las cepas C2, C4 y C6, se clasificó de manera macroscópica, microscópica y Bioquímica cada una de estas.

Figura 38. Foto C2 A) Características macroscópica B) Caracterización microscópica.



En la figura 38 se observó colonias de gran tamaño, irregulares y mucoides, presentaron un color ámbar, mientras en la foto b se observó microscopio bastones de color rojo, lo que nos indicaría que existe presencia de bacilos Gram -, también se observa que presentan capsula.

Figura 39. Foto C4 A) Características macroscópica B) Caracterización microscópica.



En la figura 39, se observó colonias lisas de borde continuo y algunas redondas, presentaron un color crema un poco brillante, mientras en la foto b se observó microscopio la presencia de bacilos grandes Gram – no esporulados.

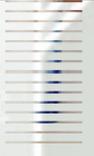
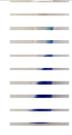
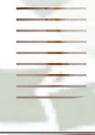
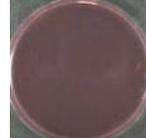
Figura 40. Foto C6 A) Características macroscópica B) Caracterización microscópica.



En la figura 40, se observó colonias de forma circular con bordes definidos y presentan un color crema, mientras en la foto b se observó la presencia de bacilos Gram +, que se encontraban solos y algunos en cadena.

Luego de haber terminado de realizar la caracterización macroscópica de cada una de las cepas, se pudo determinar parcialmente que la cepa C2 y C4 pertenecen a la familia de Gram negativos pudiendo pertenecer a los géneros de *Pseudomonas* y *Klebsiella* mientras la cepa C6 pertenecería a la familia de *Bacillus*, esta identificación fue posible según el manual de identificación bacteriana de (Barrow, Feltham, 1993).

Tabla 13. Resultado de la prueba bioquímica de la cepa C2, C4 y C6.

		RESULTADOS				
CEPAS		C2		C4	C6	
CATALASA	+		-		+	
OXIDASA	-		+		-	
GAS	+		-		-	
H ₂ S	-		-		+	
INDOL	-		-		-	
MOVILIDA	+		+		+	
D						
UREASA	+		+		+	
CITRARO DE SIMMONS	+		+		+	
LIA	+		N		+	
KIA	A/A		A/A		K/K	
TSI	A/A		K/A		A/A	
MAC CONKEY	+		+		-	

Fuente: Elaboración propia

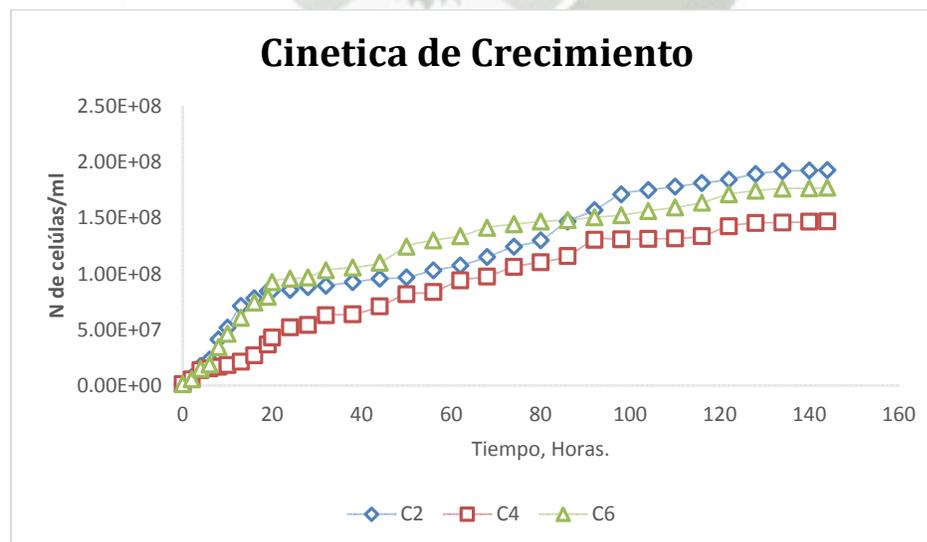
En la tabla 13 se observó los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas C2, C4 y C6 luego de haber cotejado los resultados con el libro de “Pruebas Bioquímicas de Identificación de Bacterias” (MacFaddin 2003) y el libro de “ Diagnostico Microbiológico” (Baile y Scott, 2009) más la información del diagnóstico de la caracterización macroscópica, se pudo llegar a las siguientes identificaciones : En la Cepa C2 se pudo identificar como una colonia de *Klebsiella*, en la cepa C4 se pudo identificar como una colonia de *Pseudomona* y finalmente la cepa C6 se identificó como una colonia de *Bacillus*.

Una vez ya identificados y conocidos cada uno de las cepas que se obtuvieron se realizó una investigación de estas, proporcionándonos información de que las tres cepas han sido utilizadas para diversos estudios en el ámbito de tratamiento de efluentes que contienen metales, sobre todo la más utilizada para estos procedimientos es el género de *Bacillus* existen diversa información con la mayoría de sus especies en los procesos de biosorción y bioacumulación de metales.

4.5 Crecimiento bacteriano

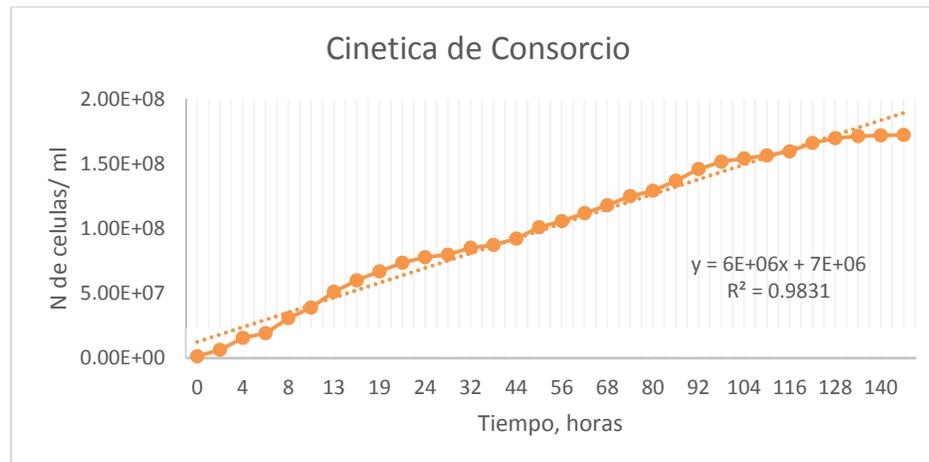
Se realizó la curva de crecimiento característica de cada una de las cepas y del consorcio para conocer sus etapas de crecimiento y si esta no variaba cuando se conformaba el consorcio, también se evaluó si su fase exponencial de las C2, C4 y C6 comparado con el consorcio.

Figura 41. Gráfica de la curva de crecimiento de las cepas C2, C4 y C6.



En la gráfica se observa por unitario el crecimiento de cada una de las cepas seleccionadas, indicándonos que al inicio no todas empiezan al mismo tiempo la fase exponencial para a un tiempo determinado las tres cepas se llegan a estabilizar.

Figura 42. Gráfica del crecimiento de consorcio en 144 h.



En la gráfica 42 se observa que el crecimiento del consorcio bacteriano, muestra que la velocidad de crecimiento es mayor, esto puede ser debido a que las tres cepas trabajen en conjunto, una ayudando a la otra para que sean más eficaces.

Después de observar la figura 41 y 42 se puede concluir que las cepas cuando trabajan en consorcio no cambian sus propiedades de crecimiento, debido a que entran en la fase exponencial casi al mismo que cuando crecen de manera unitaria, la diferencia de horas es mínima, comprendiendo que pueden trabajar en equipo de una mejor manera que cuando están solas, en un estudio de la comparación de las capacidades de cepas aisladas y un consorcio microbiano (Ramírez E. et. al.) Se puede decir que también concuerda con nosotros al momento de que las cepas trabajan mejor en conjunto apoyándose unas a otras en sus funciones que solas.

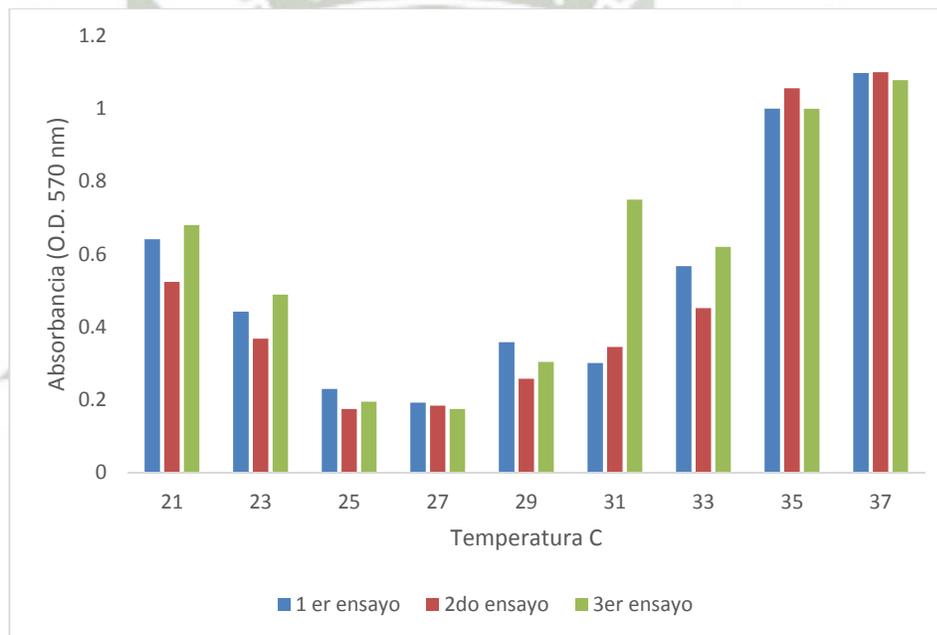
4.5.1 Crecimiento de consorcio con variación de temperatura en el efluente

Se conoce que por lo general las altas temperaturas mejoran la sorción de metales debido a su mayor actividad de la superficie de la bacteria con la energía cinética del soluto (Weber, Chakraborti, 1974; Vijayaraghavan, Yun, 2007), pero en algunos casos la alta temperatura puede causar daño, como en el caso de este consorcio ya que debido el porcentaje de remoción fue menor a altas temperaturas. Posiblemente este fenómeno se dio debido a que

estas bacterias han sido aisladas de un pozo que siempre se ha encontrado a temperaturas menores a 27 °C.

Este estudio se realizó para determinar a qué temperatura el consorcio presenta mejores condiciones para realizar la remoción de metales totales, según la figura 43 nos indica que el consorcio trabaja mejor a un rango de temperatura entre 25 a 27 C, al encontrar el rango óptimo de temperatura para el consorcio esto sugiere que podrá darse una capacidad de aumento en la adsorción de metales debido a que existirá una frecuencia de colisión entre los iones metálicos y los sitios activos del biosorbente y provocando una mayor remoción de metales pesados.

Figura 43. Gráfica del efecto de la Temperatura frente al consorcio.



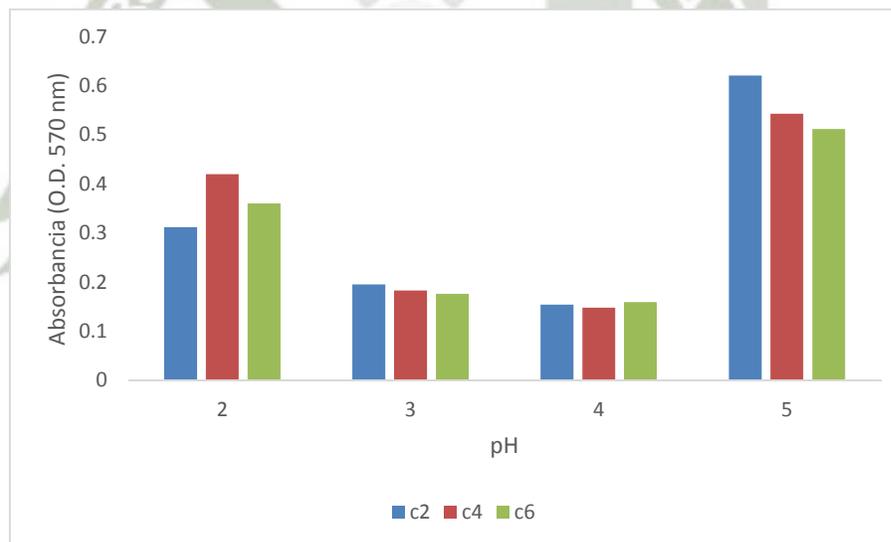
Se corrobora con otros ensayos han sido realizados que en el caso de cuando se trabaja con alguna cepa de la familia de *Bacillus* se puede lograr una optimización del proceso de remoción a un T 28° C, para la remoción de Cr (Deepti P., Rama k., 2012), otro ensayo realizado es con la cepa de *bacillus subtilis* que nos indica que a una temperatura mayor a 28 °C disminuye el porcentaje de remoción de Cu⁺, indicando que su óptimo es entre 23 a 26 °C (Yung l., 2013).

4.5.2 Crecimiento Consorcio con variación de pH en el efluente

El efecto del pH frente a una bacteria o aun consorcio es muy importante por el papel importante que este juega en el crecimiento y en las propiedades de biosorción de metales, debido a que tienen una influencia en la superficie bacteriana, así como la solución química de ion metálico (Doenmez et.al. 1999; Saeed Iqbal, 2003). Por ende para poder estudiar la interacción real de los microorganismos frente a los iones metálicos se necesita conocer el pH óptimo para el crecimiento del consorcio.

Este estudio se realizó para determinar a qué pH óptimo crece el consorcio presenta mejores condiciones para realizar la remoción de metales totales, según la figura 44 nos indica que el consorcio trabaja de manera óptima a un pH de 4, estos resultados sugieren que el consorcio para que proporcione un mejor proceso de biosorción y una mayor eliminación de metales integrales trabaje a ese pH.

Figura 44. Gráfica del efecto del pH frente al consorcio.



Se corroborar con otros ensayos han sido realizados que en el caso de cuando se trabaja con alguna cepa de la familia de *Bacillus* se puede lograr una optimización del proceso de remoción a un pH 3 (Deepti P., Rama k., 2012), otro ensayo realizado es el un consorcio de 10 cepas dos de ellas son del mismo género de bacterias que se ha hallado, es *bacillus* y *Pseudomona* ambas en el consorcio tienen un óptimo de pH en un rango de 3-4 para la remoción de Cu^+ . Esto nos indica que por lo menos dos cepas de nuestro consorcio pueden trabajar juntas a un pH óptimo en un rango entre 3-4, como se obtuvo en el estudio.

4.6 Inmovilización bacteriana

Se realizó la inmovilización bacteriana utilizando como soporte alginato, por sus características porosas y otro lado para poder tener una fácil separación de los efluentes del consorcio bacteriano y no provocar otro tipo de contaminación ya que las bacterias utilizadas son dañinas para el ser humano si no se trabajan con cuidado. Se obtuvo como resultado pellets de 1-2 mm de tamaño, consistentes luego de un tiempo de 24 h en CaCl_2 .

Figura 45. Pellets de alginato.



4.7 Biosorción de metales

Para poder realizar el estudio de biosorción de metales se utilizó las cepas inmovilizadas, también se configuro ambos sistemas a las condiciones de pH y temperatura óptima para el consorcio tenga una mejor actividad de remoción de metales.

Después de un periodo de 25 días, donde se realizó el estudio de biosorción por lotes y biosorción por columna siendo realizados a la par, durando cada ensayo 10 días y 5 días aparte para entrega de los resultados del ICP (Anexo 5). Se comparó los resultados obtenidos de los tipos de tratamientos a los que fue sometido el efluente industrial, con los valores iniciales de metales totales que presento muestra inicial. Proporcionándonos el porcentaje de remoción que se obtuvo de los tratamientos, como se observa en la Tabla N° 14 donde se muestra el porcentaje de remoción de los dos ensayos en cada uno de los métodos que se utilizó, mientras en la Figura N° 46 muestra el porcentaje de biosorción de ambos ensayos realizador por el método de biosorción por lotes, y la figura N° 47 muestra el porcentaje de biosorción de ambos ensayos realizador por el método de biosorción por columna, ambas graficas nos dan conocer que el consorcio utilizado es adecuado para la remoción de metales totales, excepto en el caso del Bario; ya que en el método de biosorción por lotes en ambos ensayos, se mantuvo el valor de este metal y proporciono un valor de 0% de remoción. Pero

en el caso de los otros metales se llegó observar en el caso de Berilio un 100 % de remoción en ambos métodos, en el caso de cobalto solo se observó un 100% en el método por columna, ambos ensayos realizados en cada uno de los métodos de biosorción utilizados se puede decir que no presentan una diferenciación significativa comprobándonos a nosotros que el consorcio utilizado para este estudio, tiene la función de adsorber metales en las condiciones óptimas para su desarrollo.

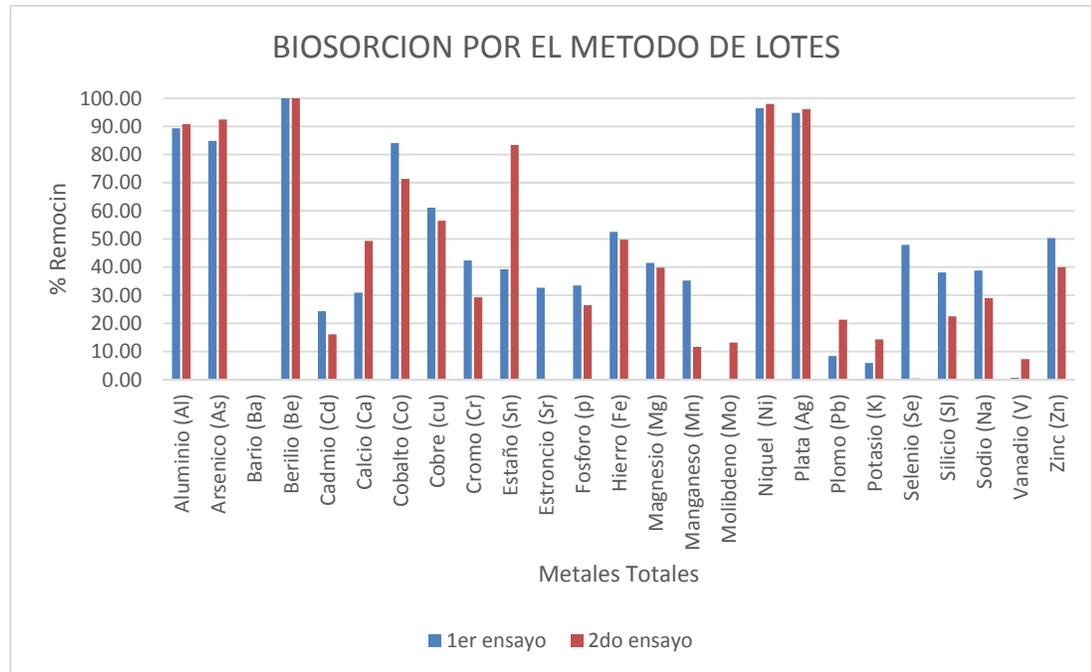
Tabla 14. Resultados del método de biosorción por lotes y el método de biosorción por columna.

METALES	BIOSORCIÓN POR LOTES		BIOSORCIÓN POR COLUMNA	
	1er Ensayo	2do Ensayo	1er Ensayo	2do Ensayo
Aluminio (Al)	89.31	90.78	86.93	92.64
Arsénico (As)	84.91	92.45	95.28	100
Bario (Ba)	0.00	0.00	6.410	55.76
Berilio (Be)	100.00	100.00	100	100
Cadmio (Cd)	24.32	16.10	16.26	25.95
Calcio (Ca)	30.92	49.30	59.88	60.31
Cobalto (Co)	84.08	71.34	84.07	100
Cobre (Cu)	61.11	56.51	66.39	65.09
Cromo (Cr)	42.32	29.31	50.17	43.64
Estaño (Sn)	39.23	83.43	55.80	39.22
Estroncio (Sr)	32.68	0.05	20.57	27.74
Fosforo (P)	33.46	26.42	30.71	35.91
Hierro (Fe)	52.56	49.76	60.95	73.90
Magnesio (Mg)	41.46	39.78	47.34	33.80
Manganeso (Mn)	35.22	11.62	34.61	40.38
Molibdeno (Mo)	0.00	13.21	62.69	56.02
Níquel (Ni)	96.45	98.00	97.22	97.45
Plata (Ag)	94.86	96.14	98.71	98.71
Plomo (Pb)	8.38	21.34	31.60	31.99
Potasio (K)	5.97	14.30	14.29	13.92
Selenio (Se)	47.87	0.47	47.86	62.08
Silicio (SI)	38.15	22.50	39.55	39.19
Sodio (Na)	38.79	28.99	41.16	40.68
Vanadio (V)	0.66	7.28	13.90	53.64
Zinc (Zn)	50.30	40.01	39.46	46.87

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 14, se puede observar el porcentaje de remoción entre los ensayos en el método de lotes no tienen una gran variación exceptuando el Mo, K, V que su variación es mayor a +- 10%, en el método por columna en ambos ensayos no se presenta una variación tan alta como en el caso anterior, se puede decir que la remoción en ambos ensayos es similar.

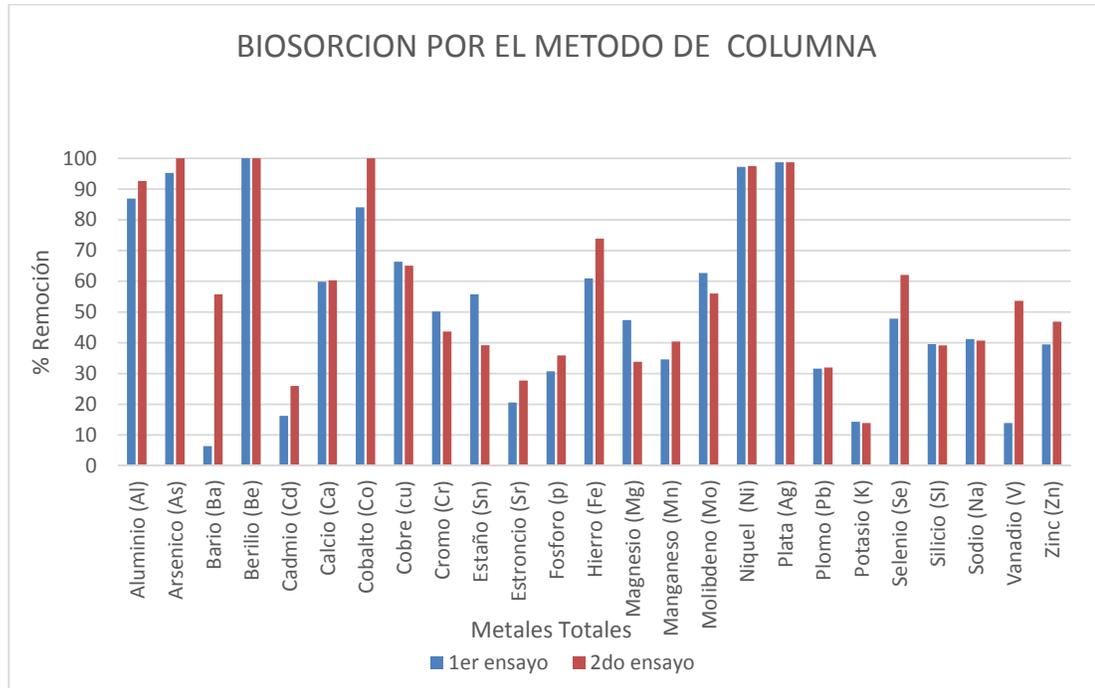
Figura 46. Grafica de comparación de los resultados de remoción de metales, del primer y segundo ensayo del método de biosorción de lotes.



En la figura 46 se puede observar que existe un porcentaje similar de remoción de todos los metales en ambos ensayos excepto en el caso de Bario que no presenta remoción en ninguna de los ensayos, finalmente se puede concluir que al final en ambos ensayos de este método se puede obtener una remoción total de 43.82%.

El ensayo de biosorción de lotes comparado con otros ensayos realizados, podemos concluir que la bacteria *Bacillus* tiene la propiedad de remover Cu^{+} en un sistema por lotes con inmobilizadas con alginato de calcio un porcentaje de 82 %, (Abhijit C. Lalitagauri R., 2008), otro ensayo también removiendo Cu^{+} por el método de lotes solo que en este caso utiliza un consorcio logra una remoción de 97% en un periodo de 28 días. (Monge O., 2008).

Figura 47. Grafica de comparación de los resultados de remoción de metales, del primer y segundo ensayo del método de biosorción de columna.



En la figura 47 se puede observar que existe un porcentaje similar de remoción de todos los metales en ambos ensayos excepto en el caso de Bario, Cadmio, Estroncio, Manganeso, Selenio, Vanadio que se obtuvo un mayor porcentaje de remoción en el segundo ensayo, en cambio en el caso de Cromo, Magnesio, Molibdeno se obtuvo una mayor remoción en el primer ensayo. En ambos ensayos en este método se puede obtener una remoción total de 54.73%.

Un estudio nos dice que la cepa inmovilizada de *Bacillus* logra remover en un sistema de columnas un 58%(CabuK A, 2013).

Finalmente se comparó entre los dos métodos, cual de ambos presento un mayor porcentaje de remoción de metales pesados, se realizó esta comparación para poder decidir si se utilizaba un biorreactor tipo Batch o un biorreactor de columnas con recirculación, como se puede observar en la Figura 48, en la mayoría de metales se observó que hubo una mayor sorción de estos cuando se utilizó el método de biosorción por columna ya que se observaron valores mucho más altos, además de presentando un 31 % de remoción del Bario a diferencia del otro método que nos dio un 0%.

Tabla 15. .Muestra el promedio en porcentaje de los ensayos del método de biosorción por lotes y el método del biosorción por columna.

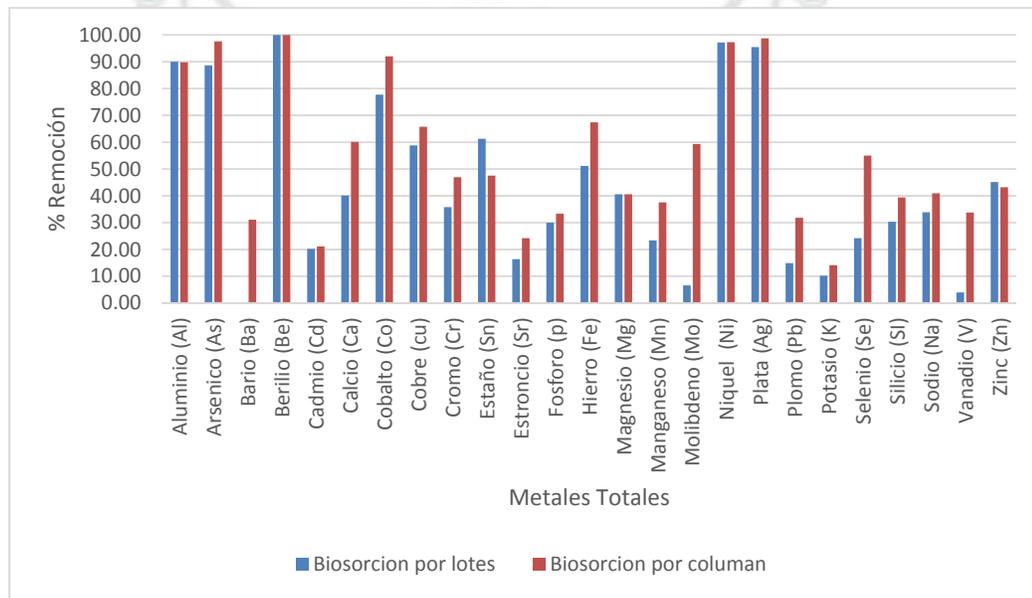
METALES	BIOSORCIÓN POR LOTES	BIOSORCIÓN POR COLUMNA
Aluminio (Al)	90.05	89.79
Arsénico (As)	88.68	97.64
Bario (Ba)	0.00	31.09
Berilio (Be)	100.00	100.00
Cadmio (Cd)	20.21	21.10
Calcio (Ca)	40.11	60.10
Cobalto (Co)	77.71	92.04
Cobre (Cu)	58.81	65.75
Cromo (Cr)	35.81	46.91
Estaño (Sn)	61.33	47.51
Estroncio (Sr)	16.36	24.16
Fosforo (P)	29.94	33.31
Hierro (Fe)	51.16	67.43
Magnesio (Mg)	40.62	40.57
Manganeso (Mn)	23.42	37.50
Molibdeno (Mo)	6.60	59.36
Níquel (Ni)	97.23	97.34
Plata (Ag)	95.50	98.71
Plomo (Pb)	14.86	31.80
Potasio (K)	10.13	14.11
Selenio (Se)	24.17	54.98
Silicio (SI)	30.33	39.38
Sodio (Na)	33.89	40.93
Vanadio (V)	3.97	33.77
Zinc (Zn)	45.16	43.17

Fuente: Elaboración propia

Se puede observar que el promedio del porcentaje de remoción de cada método no se presenta una gran diferencia en la mayoría de los metales si se compara, exceptuando el Sn que tiene una mayor remoción en lotes, en cambio el Ba, Ca, Co, Mo, Pb, V presentan un mayor rango de remoción en un sistema de columna.

Debido a lo comparado con otros estudios y a los resultados obtenidos se dice que el consorcio que se posee tiene la facultad de realizar remoción de metales, y con la inmovilización con alginato de calcio, proporciona la optimización de los métodos estudiados. En cuanto al grafico comparativo entre ambas metodologías se tomara en consideración el método por columna, debido a que existe una mayor remoción en Ba, Ca, Co, Mo, Pb, V en porcentajes considerables, aparte de que se observa en todos los demás metales una remoción.

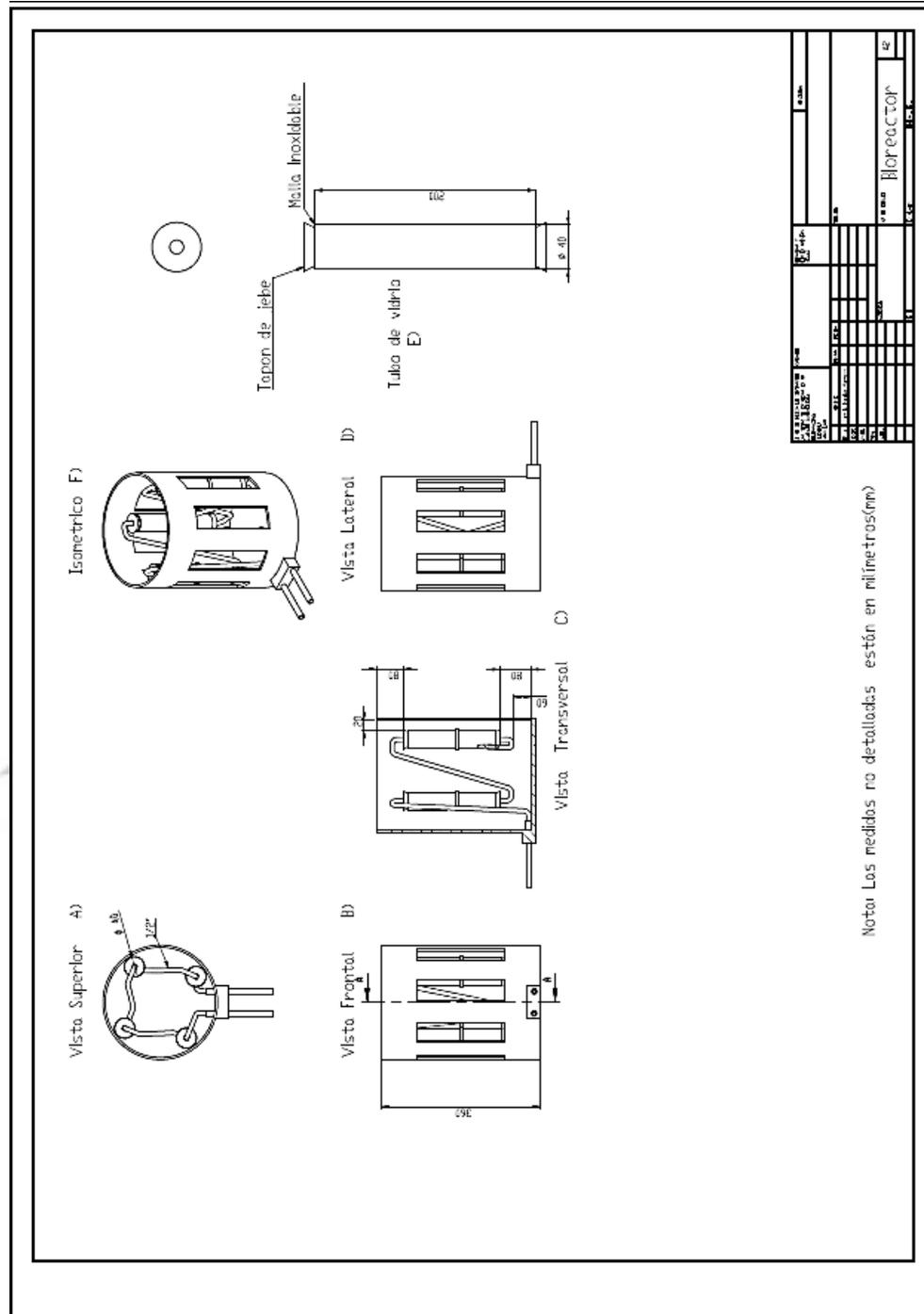
Figura 48. Grafica de comparación de los resultados de remoción de metales, del método de biosorción por lotes y el método de biosorción por columna.



4.8 Diseño y configuración del biorreactor PFTR

A continuación se observara el esquema del diseño en 2 D del biorreactor tipo PFTR a nivel laboratorio realizado en AutoCAD 2013; en el plano se observara la vista superior del biorreactor que es el punto A con sus medidas en pulgadas de los tapones y los codos, en el B se observara la vista frontal ; en el C la vista transversal del reactor; en el D se observara la vista lateral con sus medidas en pulgadas; en el E se observara el tubo y los tapones, y por último en el F se verá su imagen isométrica, que nos indica de qué forma debe de quedar el biorreactor (Figura 49), también se observara el esquema del diseño del biorreactor en 3D de lo que se utilizó para su funcionamiento que fue el tanque de entrada, la bomba, el biorreactor y el tanque de salida. (Figura 50).

Figura 49. Plano del biorreactor PFTR a nivel laboratorio.



Este biorreactor utiliza una bomba peristáltica. Se coloca el efluente industrial en el tanque de almacenamiento para el ingreso del biorreactor PFTR por la parte inferior con la ayuda de la bomba, el efluente ingresa con un flujo de 0.15 ml/s por el serpentín interior por un tiempo de 3 semanas este efluente se encuentra ese tiempo en contacto con los pellets (Cepas inmovilizadas), después de ese tiempo pasa al tanque de salida.

4.8.1 Requisitos para el funcionamiento del biorreactor

- **Determinación del flujo de la bomba:** Para la utilización del biorreactor PFTR se utilizó una bomba BL F1210, el flujo se determinó manualmente. Se determinó el flujo a utilizar, después de haber realizado tres medidas previas de flujo y de esa manera poder obtener un promedio, estos datos se presentarán a continuación en la tabla 16:

Tabla 16. Datos del tiempo tardado de tres ensayos en que el efluente lleno 10 ml en una probeta.

	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
Tiempo (s)	66	65	64

Fuente: Elaboración propia.

Utilizando los datos obtenidos en la probeta se pudo utilizar el flujo de entrada dividiendo el volumen de la probeta entre el tiempo.

Tabla 17. Datos del flujo de tres ensayos.

	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
Flujo (ml/s)	0.152	0.154	0.156

Fuente: Elaboración propia.

- **Determinación de las dimensiones del biorreactor:** Las dimensiones se determinaron respecto al volumen del efluente que se deseaba tratar. El volumen a tratar fue un volumen de 1200 ml.

Tabla 18. Dimensiones del tubo del biorreactor PFTR.

TUBO	LARGO (cm)	DIÁMETRO (cm)	VOLUMEN (cm ³)
Externo	80	4	1005.312
Interno	80	3.8	906.832

Fuente: Elaboración propia.

Después de determinar que el tubo tendrá un largo de 80 cm, este es demasiado largo, por lo cual se decidió fragmentar en 4 tubos pequeños de 20 cm cada uno.

Luego de haber decidido las dimensiones se determinó el tiempo de residencia. Utilizando la ecuación N° 6 se obtiene como $THR = 5,888.51$ s, como resultado de la división de 906.832 ml con 0.154 ml/s.

El valor de TRH, está relacionado al tiempo de residencia del medio en el interior del biorreactor, presentando un valor de 5 888.51s o 98 min, ese es el tiempo que se demora el efluente en recorrer el biorreactor.

Para poder conocer el espacio hueco y el espacio ocupado del reactor primero se debe de conocer el volumen hueco, el cual se obtiene de utilizar la ecuación 10, el volumen hueco sería 272.052 cm³.

Usando ese valor, se determina el volumen hueco y el volumen ocupado utilizando la ecuación N° 7, Teniendo como resultado $\epsilon = 0.3$ y $\psi = 0.7$. en porcentaje el valor de $\epsilon = 30\%$ y para $\psi = 70\%$, todos los valores hallados nos indica cuales son los valores óptimos para el funcionamiento del biorreactor, ya que se sabe que el valor de $\epsilon + \psi$ debe de ser 1.

4.9 Análisis de la muestra tratada por ICP

Los resultados de la concentración obtenidos por el método de ICP (Anexo 6), de la remoción de metales totales por la consorcio en un sistema PFTR, serán mostrados a continuación en la tabla N° 19, los dos ensayos realizados se realizaron en dos sistemas PFTR al mismo tiempo en idénticas condiciones.

Se observara los Metales totales, la concentración inicial y la concentración final de cada uno de los ensayos en un periodo 3 semanas de recirculación. Por otra parte se observara en la figura 51 y 52. Una gráfica comparativa con los valores remoción metales totales en los dos sistemas PFTR.

En la tabla N° 19 se puede observar que los metales como Be, Co, Ni, Ag, Pb, Se y V, fueron absorbidos totalmente por los consorcios, aunque se puede decir que este consorcio presenta una mayor afinidad por Cu, Cr y Na, debido a que estos metales presentaban un alta concentración dentro de la muestra y después de su tratamiento bajaron en casi un rango de 85% a 90%.

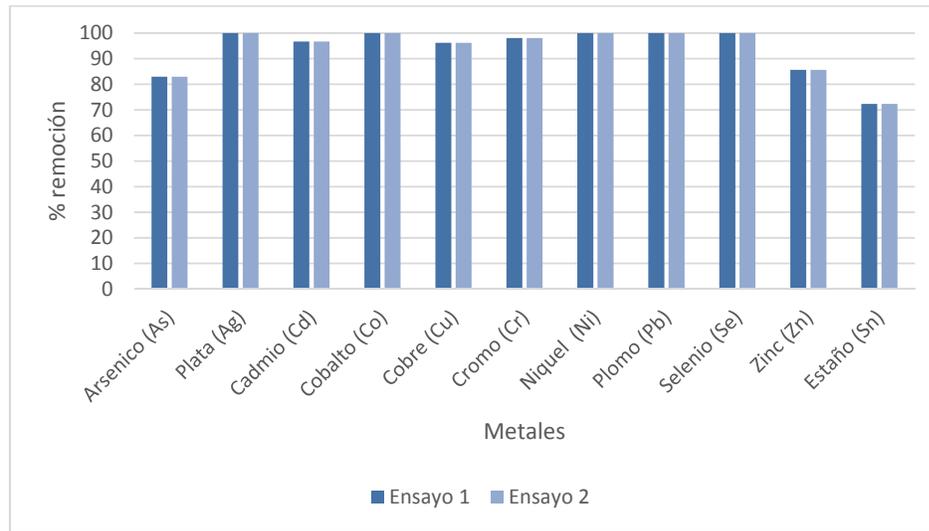


Tabla 19. Concentración inicial de metales totales, concentración en el 1er. Ensayo y el 2do. Ensayo del sistema PFTR.

METALES	UNIDAD	MUESTRA	1ER ENSAYO	2DO ENSAYO
Aluminio (Al)	mg/l	4.2950	0.219	0.295
Arsénico (As)	mg/l	0.1060	0.018	0.014
Bario (Ba)	mg/l	0.1560	0.017	0.028
Berilio (Be)	mg/l	0.0006	0	0
Cadmio (Cd)	mg/l	0.0621	0.002	0.002
Calcio (Ca)	mg/l	85.703	12.58	15.26
Cobalto (Co)	mg/l	0.0314	0	0.001
Cobre (Cu)	mg/l	32.421	1.222	1.143
Cromo (Cr)	mg/l	7.0801	0.133	0.098
Estaño (Sn)	mg/l	0.0181	0.005	0.007
Estroncio (Sr)	mg/l	0.6283	0.357	0.209
Fosforo (P)	mg/l	18.055	2.291	2.729
Hierro (Fe)	mg/l	8.8530	0.26	0.139
Magnesio (Mg)	mg/l	22.751	12.75	8.964
Manganeso (Mn)	mg/l	8.0321	0.048	0.047
Molibdeno (Mo)	mg/l	4.6800	0.319	0.147
Níquel (Ni)	mg/l	0.9021	0	0
Plata (Ag)	mg/l	0.0778	0	0
Plomo (Pb)	mg/l	0.7793	0	0
Potasio (K)	mg/l	24.013	11.07	7.071
Selenio (Se)	mg/l	0.0211	0	0
Silicio (SI)	mg/l	24.801	7.59	4.442
Sodio (Na)	mg/l	353.21	46.53	38.54
Vanadio (V)	mg/l	0.0151	0	0.002
Zinc (Zn)	mg/l	2.0121	0.289	0.247

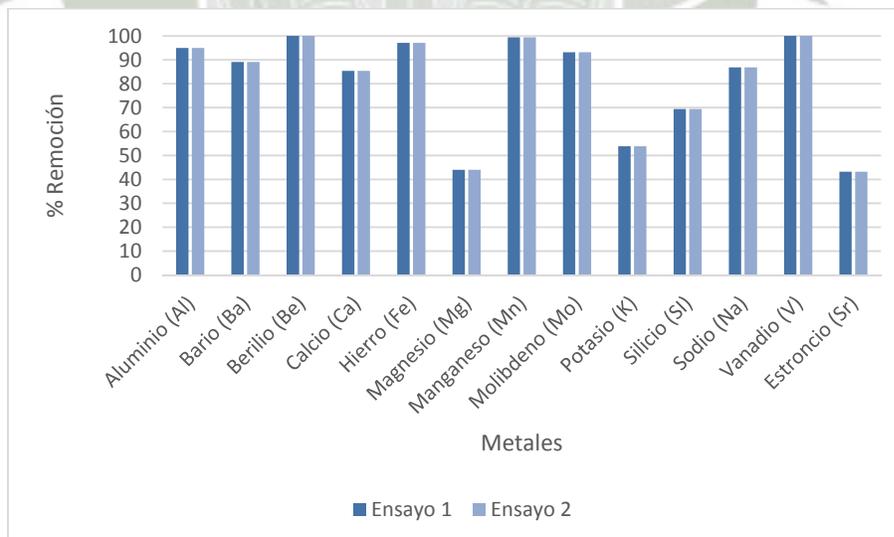
Fuente: Elaboración propia.

Figura 51. Grafica de comparación entre los dos sistemas de PFTR.



En la gráfica se observa el porcentaje de remoción solo de los metales más tóxicos para el ser humano y para el medio ambiente, casi en todos se obtienen valores por encima del 90%, excepto el As, Sn y Zn.

Figura 52. Grafica de comparación entre los sistemas de PFTR.



En la gráfica se observa el porcentaje de remoción solo de los metales con menor toxicidad para el ser humano y para el medio ambiente, se obtuvo menor al 50% en Mg, Sr y K, en los demás el % de remoción fue mayor al 80 %.

Luego de haber observado los resultados del porcentaje de remoción en ambos gráficos y las concentraciones de los metales en ppm en la tabla, se puede decir que ambos sistemas PFTR presentan el mismo porcentaje de remoción en todos los metales, pero si se observa con atención en el ensayo uno, los metales Al, Ba, Ca, Co, Sn, P y V; presentan un mayor valor de remoción, mientras en el ensayo 2 los metales con mayor porcentaje de remoción son Sr, Mg, Mo, P y Silicio. Por otra parte también se puede decir que existe una mejor remoción frente a metales pesados debido a que hay un mayor porcentaje de remoción, en el caso de los otros metales con menos toxicidad no se obtuvo un alto porcentaje de remoción en todos estos metales, dándonos dos por debajo del 50% el Mg y Sr. Finalmente los resultados nos proporciona la información de que el consorcio de bacterias Gram – y Gram +, puede remediar el efluente aproximadamente en un 87.86 % de metales totales.

4.10 Análisis ANOVA

Para el análisis se configuró una H_0 (hipótesis nula), esta afirma que en los dos ensayos realizados o grupos existe una igualdad, del mismo modo la H_a (hipótesis alternativa) afirma que al menos las dos medias no son iguales.

Para realizar este proceso se debe de conocer que existe un riesgo, que es cuantificado por el valor de p, el cual expresa una probabilidad de aceptar una hipótesis nula como cierta o cuando la cierta podría ser una hipótesis alternativa. Para poder saber qué tipo de hipótesis es, el valor de p debe de ser mayor a 0.05, lo cual indica una seguridad del 95% al momento de aceptar una hipótesis.

4.10.1 Análisis estadístico de comparación remoción de metales en de los métodos de biosorción por lotes y biosorción por columna

Se utilizó los últimos datos experimentales obtenidos de la remoción de metales por medio del programa de Excel se obtuvo la tabla N° 20 de ANOVA en la que se observa que el nivel de probabilidad del Test es 0.8634, el cual es mayor a 0.05, también se observa que el valor de F no es mayor al valor crítico de F, significa que existe la mayor evidencia experimental

para aceptar la hipótesis nula, es decir que no existe diferencia significativa entre los datos. Concluyendo que la remoción de metales en ambos métodos son similares.

Tabla 20. Cuadro de prueba ANOVA

ANÁLISIS DE VARIANZA							
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Entre grupos	60.9077147	1	60.9077147	0.02991722	0.86343703	4.051748692	
Dentro de los grupos	93650.2342	46	2035.87466				
Total	93711.1419	47					

Fuente: Elaboración propia.

4.10.2 Análisis estadístico de la remoción de metales en dos ensayos utilizando el biorreactor tipo PFTR

Se utilizó los últimos datos experimentales obtenidos de la remoción de metales de las concentraciones finales de cada metal y por medio del programa de Excel se obtuvo la Tabla 21 en la que se observa que el nivel de probabilidad del Test es 0.7986, el cual es mayor a 0.05, también se observa que el valor de F no es mayor al valor crítico de F, significa que existe la mayor evidencia experimental para aceptar la hipótesis nula, es decir que no existe diferencia significativa entre los datos. Concluyendo que la remoción de metales en ambos biorreactores es similar, proporcionándonos la información de que el consorcio funciona adecuadamente en el PFTR.

Tabla 21. Cuadro de prueba ANOVA.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5.59718502	1	5.59718502	0.06585164	0.7986197	4.05174869
Dentro de los grupos	3909.85727	46	84.9968971			
Total	3915.45445	47				

Fuente: Elaboración propia.

4.11 Comparación de LOS V.M.A. (SEDAPAL) con los resultados obtenidos en el tratamiento para metales.

Se comparó los resultados obtenidos con los “VALORES MÁXIMOS ADMISIBLES (VMA)” de las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado (SANITARIO D.S. N° 021-2009-VIVIENDA), debido a que en el Perú aún no existe una tabla con los LMP de metales que debe descargar la industria Metal- Mecánica, Obteniendo lo siguiente:

Tabla 22. Comparación de los VMA con las concentraciones de los efluentes expuestos a la biorremoción.

METALES	VMA(mg/L)	MUESTRA(mg/L)	1ER ENSAYO	2DO ENSAYO
ALUMINIO	10	4.295	0.219	0.295
ARSENICO	0.5	0.106	0.018	0.014
CADMIO	0.2	0.0621	0.002	0.002
COBRE	3	32.421	1.222	1.143
CROMO TOTAL	10	7.080	0.133	0.098
HIERRO	2	8.853	0.26	0.139
MANGANESO	4	8.032	0.048	0.047
NIQUEL	4	0.902	0	0
PLOMO	0.5	0.779	0	0
ZINC	10	2.012	0.289	0.247

. Fuente: Elaboración propia.

Según la Tabla N° 22 nos da conocer que este efluente presenta valores por debajo del V.M.A que nos proporciona sedapar, dándonos la opción de acoplar unos atamientos físicos como una trampa de grasas y un filtro para lo sólidos y de esa manera poder reutilizar el efluente disminuyendo el uso de agua y los costos de la empresa.



V. CONCLUSIONES

PRIMERA.- Se logró la remoción de metales en un 87.86% en el efluente industrial metal-mecánico utilizando un consorcio bacteriano nativo en un biorreactor PFTR.

SEGUNDA.- Se logró caracterizar fisicoquímicamente obteniendo su 406 mg/L de DQO, 193 mg/L de DBO₅, 629 mg/L S.S.T., 430 mg/L de aceites y grasas, temperatura de 19.5 °C, 3.5 pH, 2.41 turbidez, 0.904 µs/m de conductividad, y encontrando los siguientes metales As, Ag, Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb, Se, Sn, Zn, Al, Ba, Be, Ca, Fe, K, Mn, Mg, Mo, Na, Si, Sb, Sr, V. y en el caso de la caracterización microbiológica se obtuvo como resultado las cepas de *Bacillus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomona spp.*

TERCERA.- Se evaluó la biosorción de metales totales por el método de columna y el método de lotes, presentando un mayor valor de remoción en todos los metales presentes en el efluente, en el sistema de biosorción por método de columna. Se obtuvo como valores óptimos de pH y temperatura del efluente en 3-4 de pH y 25-27 °C.

CUARTO.- Se elaboró un biorreactor PFTR con columnas empacadas y flujo de recirculación, que con las condiciones adecuadas para el funcionamiento óptimo de este, después de un tiempo de 3 semanas de funcionamiento, logro 87.86% en la biorremoción de metales.

QUINTA.- Se puede decir que este sistema de ingeniería es óptimo para la biorremoción de metales, ya que compararlo con los V.M.A. este logro encontrarse por debajo de los límites y poder ser reutilizados en el proceso o eliminados sin contaminar.

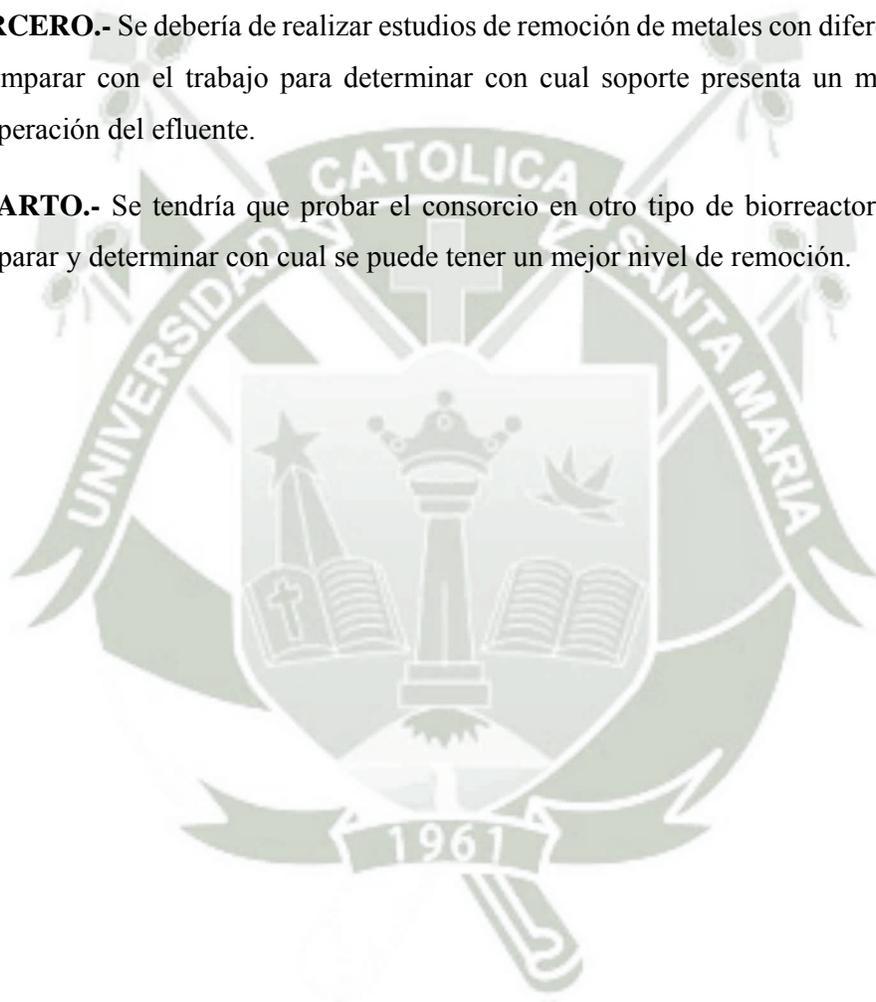
VII. SUGERENCIAS

PRIMERO.- Se debería de realizar la identificación molecular de cada una de las cepas que componen el consorcio, para tener una identificación completa de cada una de ellas.

SEGUNDO.- Se tendría que realizar las pruebas de antagonismo y de actividad emulsificante para corroborar que las tres cepas pueden trabajar juntas como consorcio.

TERCERO.- Se debería de realizar estudios de remoción de metales con diferentes soportes y comparar con el trabajo para determinar con cual soporte presenta un mayor nivel de recuperación del efluente.

CUARTO.- Se tendría que probar el consorcio en otro tipo de biorreactores para poder comparar y determinar con cual se puede tener un mejor nivel de remoción.



VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1) Acosta I., Moctezuma M., Cardenas J., Gutierrez C. (2007). Biadsorción de Cadmio (II) en solución acuosa por biomasa Fúngica, *Inf. Tec.* 18, 9-14.
- 2) Atkison B., Box F., Kasan H.(1998). Considerations for application of biosorption technology to remediate contaminated industrial effluents. *Water S.A.*, 24, 129-135.
- 3) Alexander, M. (1999). Biodegradation and Bioremediation. *Academic Press, London*, 2.
- 4) Atlas R.M. y Unterman, R. (1999). Bioremediation. In: Demain AL & Davies JE (Eds). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2, 666-681.
- 5) Ahalya N., Ramachandran T. Kanamadi R. (2003). Biosorption of heavy metals. *Res. J. Chem. Environ.*, 7, 71-79.
- 6) Agarwal S.K. (1998). Environmental Biotechnology. *APH Publishing Corporation*, 1, 267-289.
- 7) Abhijit C., Lalitagauri R. (2008) biosorption of Cu (II) by immobilized biomass of *Bacillus cereus* from aqueous solution. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67, 629-634.
- 8) Ashok K., Blawant S., Vishnu D. (2010). Biosorption of heavy metals by for acclimated microbial species, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* pp., *Staphylococcus* spp. And *Aspergillus Niger*. *J. BIOL. ENVIRON. SCI*, 4(12), 97-108.
- 9) Atkinson B., (1986). Reactores bioquímicos. Editorial Reverte S.A.
- 10) Blanch A. (2007). Biotecnología i medi ambiente. *Les biotecnologies Treballs de la Societat Catalana de Biologia*, 58, 175-178
- 11) Cañizares-Villanueva R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Latinoamericana de microbiología*, 42, 131-143.
- 12) Cabuk A., Ilhan S. (2003) Cu²⁺ removal in a biosorption column by immobilized bacterial biomass. *Journal of minela processing and environmental protection*, 3(1), 67-74
- 13) Cohen Y. (2001). Biofiltration- the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material. *Bioresource Technology*.77, 257-274.

- 14) Charrier J. M. (1996). Vanadium Sorption by Chitosan: Kinetics and Equilibrium, *Water Res*, 30, 465-475.
- 15) Cabuk A., Ilhan S. (2003). Cu²⁺ removal in a biosorption column by immobilized bacterial biomass. *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*, 3(1), 67-74.
- 16) Chang J., Law R., Chang C. (1997). Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Research*, 31, 1651-1658.
- 17) Clausen C. (2000). Isolation metal- tolerant bacteria capable of removing copper, chromium and arsenic from treated wood. *Waste Manage Res.*, 18, 264-268.
- 18) Cols N., Roepstorff K., Gonzales R., Atrian S. (2001) Secretion of mouse-metallothionein in by engineered *E. coli* cells in metal-enriched cultures media. *J. Mol. Microbiol, Biotechnol*, 3(4), 507-512
- 19) DeLeo P., Ehrlich H. (1994). Reduccion of hexavalent chromium by *Pseudomonas fluorescens* LB300 in batch and continuous cultures. *Appl. Microbial Biotechnol*, 40, 756-759.
- 20) Deepti P., Chandrashekhar j. Rama K. (2012) Biosorption of heavy metals from Aqueous solution using *Bacillus licheniformis*. *Appl. Sci. Technol*, 10(2), 12-19.
- 21) Dwyer D., Krumme M., Tiedje J. (1986). Kinetics of phenol Biodegradation by an immobilized methanogenic consortium. *Applied and environmental microbiology*, 52,345-351.
- 22) Eweis, J., Ergas, S., Chang, D., y Schoeder, E. (1999) Principios de Biorrecuperacion. Edit. McGraw-Hill.Madrid.
- 23) Fergusson J. E. (1990). The heavy elements: Chemistry environmental impact, and health effects. Pergamon Press. 614 páginas.
- 24) Garza M. (2005). Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover Pb, Cr, Cd, Cu, Zn y Ni. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Cuba.
- 25) Gadd, G.M. (1990) Biosorption. *Chemistry and industry*. 13,1990.
- 26) Garzon J., Barragan B. (2008). Inmovilización microbiana: Técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista de Sistemas Ambientales*, 2,23-34.
- 27) Gulay B., Yaluk M. (2009). Construction a hybrid biosorbent using Ca- alginate for biosorption of Cu (II), Zn (II) and Ni (II). *Bioresource technology*, 100, 186-193.

- 28) Haluk C., Ulku Y. (2001). Biosorption of Ni and Pb by *Phanerochaete crysosporium* from a binary metal system –kinetics. *Journal home*, 27.
- 29) Hussein H., Farag S., Moawad H. (2003). Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals contaminants. *Arab J. Biotchnol.*, 7, 13-22.
- 30) Hussein H. (1999). Influence of heavy metals on the biodegradation of hazardous wastewater. Ph.D Thesis, University of Alexandria.
- 31) Ibañez J.P., Umetsu, Y. (2002) Potential of protonated alginate beads for heavy metals uptake. *Hidrometallurgy*, 64, 89-99.
- 32) Jang L.; Brand W. (1990). Feasibility of using alginate to absorb dissolved Copper from aqueous media. *Environ Process*, 9, 269-274.
- 33) Khanafari A. Eshgdoost S., Mashinchian A. (2008). Removal of lead chromium from aqueous solution by *Bacillus circulans* Biofilm. *Environ Health. Sci eng.*, 5(3), 195-200.
- 34) Kratochvil D., Volesky B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends Biotechnonology*, 16(7),291-300.
- 35) Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I., Marchant R., Koutinas A. (2004). Inmovilizacion Technologies and support materials suitable in alcohol baverages produccion a review. *Food Microbiology*, 1, 377-397.
- 36) Koneman E.W., Allen S. Janda W., Schenrchenberger P., Winn W. (1999). Diagnóstico microbiológico. México: Editorial Panamericana.
- 37) Lima A., Ribeiro M., Souza S., Teixeira P., Silva R., Meirelles C., Hofer E. (2012). Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacterial isolated from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1620-1631.
- 38) Lopez I., Borzacconi L. (2009). Introducción al Diseño de Reactores. Facultad de Ingeniería
- 39) Mac Faddin J.F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México: Editorial Médica Panamericana.54-221.
- 40) Mahmood R., Sharif F., Ali S., Hayyat M. (2013). Bioremediation of textile effluent by indigenous bacterial consortia and its effects on *Zea mays* L. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 23(4), 1193-1199.
- 41) Manisha N., Dinesh S., Arun K. (2011). Removal heavy metals from industrial effluent using bacteria. *Enviromental Sciences*, 2(2).

- 42) Mijangos F., Jodra Y. (1995). Viabilidad de alginatos como intercambiadores de iones para el tratamiento de aguas residuales. *Afinidad*, setiembre- octubre, 459.
- 43) Metcalf and Eddy (1995) Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, vertido y reutilización, McGraw-Hill, Madrid.
- 44) Monge O., Guerrero P., Almendariz F. (2009), capacidad de adsorción del cobre utilizando un consorcio bacteriano aislado del río San Pedro, Sonora. *XXVIII Convención Minera Internacional*.
- 45) Moreira F., Siqueira, J.O. (2006) Microbiología e Bioquímica do Solo. atual. e ampl. Lavras: Ufla, 2,729.
- 46) Nakajima A., Sakaguchi T. (1986). Selective Accumulation of Heavy Metals by Microorganism. *Microbiology Biotechnology*, 24, 59.
- 47) Nazar J. (2007). Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol*, 67, 61-72.
- 48) Onofre M., Valenzuela J., Acedo E., Certucha T., Almendariz F. Efecto del pH en el proceso de Biosorción de Cobre con bacterias aerobias. Universidad de Sonora.
- 49) Onofre M., Valenzuela J., Acedo E., Certucha T., Almendariz F. (2008) Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en Zeolita Natural. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 24(3), 107-115.
- 50) Oliveira M. (2003). Estudio de la biosorción de cobre por perlas de alginato de calcio. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- 51) Pardo R. Herguedas M., Barrado E. (2003). Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 376, 26-32.
- 52) Nies D. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbial and Biotechnology*, 51(6), 730.
- 53) Raraz A. (1995). Biological and biotechnological waste management in materials processing. *JOM, February*, 56-62.
- 54) Rajendran P. Muthukrishnan J. Gunasekaran P. (2003, September) Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*. 41,935-344.
- 55) Rehman A., Zaboer A., Munner B., Hasnain S. (2008) Chromium tolerance and reduction potential of a *Bacillus* sp. Isolated from metal contaminated wastewater. *bulletin of Environmental and Contamination Toxicology*, 81, 25-29.

- 56) Sabyasachi C., Anindita M., Agniswar S., Pranab R. (2012). Bioremediation of lead by lead-resistant microorganisms, isolates from industrial sample. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 290-295.
- 57) Shumate S., Strandberg G. (1985) Accumulation of metals by microbial cells, *Comprehensive Biotechnology*, 4.
- 58) Tapia H, M., Maldonado G. (2001). "Bioremediación de metales tóxicos en efluentes aplicando biosorción". Tesis de la facultad de Geología, Mina, Metalúrgica y Ciencias geográficas, Universidad tecnológica de México, DF.
- 59) Torsvik, V., Goksøyr, J., and Daae, F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbio.*, 56, 782- 787.
- 60) Velings N., Medstdagh M., (1995) Physico-Chemical Properties of Alginate Gel Beads. *Polymer Gels and Networks*, 3, 311-330.
- 61) Volesky B., Holan Z. (1995). Biosorption for the next century. Chemical Engineering department. Mc Gill University, Canada.
- 62) Volesky B. (1999). Biosorption of Heavy metals. CRC Press, Boca Raton, Florida. 408.
- 63) Volesky B. (2004). Biosorption of Heavy metals. CRC Press, Boca Raton, Florida. 408.
- 64) Wang X.S. Qin Y., Li Z. F., (2009) Biosorption of zinc from aqueous solution by rice: Kinetics and equilibrium studies. *Separation Science and Technology*, 41(4), 747-756.
- 65) Wang J., Cheng, C.(2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: *Biotechnology Advances*, 24,427.
- 66) Zahoor A., Rehman A. (2009). Isolation of Cr (VI) reducing bacteria from industrial effluents and chromium containing wastewater. *J. Environ. Sci.*, 21, 814-820.



Anexo 1

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

TITULO II, DE LA CONSERVACION Y PRESERVACION DE LAS AGUAS

Capítulo II, De la Preservación

Artículo 22°.- Prohibiciones

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

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

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

Artículo 23°.- Prohibición de vertimiento de residuos

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

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

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

Artículo 25°.- Suspensión del suministro de aguas

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



Anexo 2

D.S. N° 002-2008-MINAM

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

PARÁMETRO	UNIDAD	Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable			Aguas superficiales destinadas para recreación	
		A1 Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección	A2 Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional	A3 Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento avanzado	B1 Contacto Primario	B2 Contacto Secundario
		VALOR	VALOR	VALOR	VALOR	VALOR
INORGÁNICOS						
Aluminio	mg/L	0.2	0.2	0.2	0.2	**
Antimonio	mg/L	0.006	0.006	0.006	0.006	**
Arsénico	mg/L	0.01	0.01	0.05	0.01	**
Bario	mg/L	0.7	0.7	1	0.7	**
Berilio	mg/L	0.004	0.04	0.04	0.04	**
Boro	mg/L	0.5	0.5	0.75	0.5	**
Cadmio	mg/L	0.003	0.003	0.01	0.01	**
Cobre	mg/L	2	2	2	2	**
Cromo Total	mg/L	0.05	0.05	0.05	0.05	**
Cromo VI	mg/L	0.05	0.05	0.05	0.05	**
Hierro	mg/L	0.3	1	1	0.3	**
Manganeso	mg/L	0.1	0.4	0.5	0.1	**
Mercurio	mg/L	0.001	0.002	0.002	0.001	**
Níquel	mg/L	0.02	0.025	0.025	0.02	**
Plata	mg/L	0.01	0.05	0.05	0.01	0.05
Plomo	mg/L	0.01	0.05	0.05	0.01	**
Selenio	mg/L	0.01	0.05	0.05	0.01	**
Uranio	mg/L	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Vanadio	mg/L	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Zinc	mg/L	3	5	5	3	**

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

Anexo 3

Medio Mínimo de Goldman

Fosfato ácido di potásico	18 g.
Fosfato diácido de potasio	6 g.
Sulfato de Magnesio	0.02g.
Sulfato diamónico	4g.
Etanol	20 ml.
Agua destilada	1000 ml
Esterilización	121°C x 15 min.
Extracto de levaduras	3%

Medio Mac Conkey

Peptona de Carne	1.5 g.
Peptona de Gelatina	17 g.
Tripteina	1.5g.
Lactosa	10 g.
Mezcla de sales biliares	1.5 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Rojo neutro	0.03g
Cristal violeta	0.001g
Agar	13.5 g.
Esterilización	121°C x 15 min.

Medio PDA (Potato Dextrose Agar)

Extracto de papa	4 g.
Glucosa	20 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1000 ml.
Esterilización	121°C x 15 min.



Anexo 4



Prueba de S.S.T.



Cinética microbiana y conteo en cámara de Neubauer



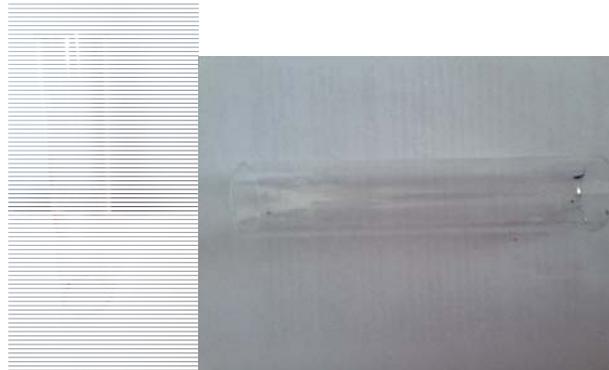
Lectura del consorcio frente a diferentes parámetros de pH y temperatura.



Inmovilización de consorcio, pellets de alginato.



Enchquetado del biorreactor, vista frontal y vista interior.



Tubo de pírrex 4 cm *20 cm vista vertical y horizontal.



Columna empaquetada con pellets.



Foto de Biorreactor montado en el laboratorio y foto final del efluente industrial.



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 + 51 54 251210 ANEXO 1166
laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe http://www.ucsm.edu.pe Apdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA25G14.001300

Nombre del Cliente : [REDACTED]
Dirección del Cliente : [REDACTED]
RUC : [REDACTED]
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : AGUA INDUSTRIAL
Tamaño de muestra : 100 mL
Fecha de Recepción : 25/09/2014
Fecha de Inicio del Ensayo : 25/09/2014
Fecha de Emisión de Informe : 05/10/2014
Página : 2 de 2

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L) Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7	
Sodio (Na)	250,8
Talio (Tl)	No detectable
Titanio (Ti)	0,014
Vanadio (V)	0,021
Zinc (Zn)	1,207

OBSERVACIONES:

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


Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFDA 00624
JEFE DE LABORATORIO LECC



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

Anexo 6



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe ☎ http://www.ucsm.edu.pe 📍 Apto. 1360
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA22L14.001518A

Nombre del Cliente	: [REDACTED]
Dirección del Cliente	: [REDACTED]
RUC	: [REDACTED]
Condición del Muestreo	: POR EL CLIENTE
Descripción	: AGUA MUESTRA 1
Tamaño de muestra	: 250 mL
Fecha de Recepción	: 17/01/2015
Fecha de Inicio del Ensayo	: 17/01/2015
Fecha de Emisión de Informe	: 22/01/2015
Página	: 1 de 2

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L) Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7	
Plata (Ag)	No detectable
Aluminio (Al)	0,219
Arsénico (As)	0,018
Boro (B)	0,369
Bario (Ba)	0,017
Berilio (Be)	No detectable
Bismuto (Bi)	No detectable
Calcio (Ca)	12,59
Cadmio (Cd)	0,002
Cobalto (Co)	No detectable
Cromo (Cr)	0,133
Cobre (Cu)	0,222
Hierro (Fe)	0,26
Mercurio (Hg)	0,003
Potasio (K)	11,07
Litio (Li)	0,004
Magnesio (Mg)	12,75
Manganeso (Mn)	0,048
Molibdeno (Mo)	0,319
Sodio (Na)	46,53
Niquel (Ni)	No detectable
Fosforo (P)	2,291
Plomo (Pb)	No detectable
Antimonio (Sb)	No detectable
Selenio (Se)	No detectable
Silicio (Si)	7,59

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



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



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



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA22L14.001518B

Nombre del Cliente : [REDACTED]
Dirección del Cliente : [REDACTED]
RUC : [REDACTED]
Condición del Muestreo : POR EL CLIENTE
Descripción : AGUA MUESTRA 2
Tamaño de muestra : 250 mL
Fecha de Recepción : 17/01/2015
Fecha de Inicio del Ensayo : 17/01/2015
Fecha de Emisión de Informe : 22/01/2015
Página : 2 de 2

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L) Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7	
Estaño (Sn)	0,007
Estroncio (Sr)	0,209
Titanio (Ti)	No Detectable
Talio (Tl)	No Detectable
Vanadio (V)	0,002
Zinc (Zn)	0,247

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

Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFPA 00624
JEFE DE LABORATORIO LECF



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