

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO**

**CARRERA:  
INGENIERÍA AMBIENTAL**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERO E  
INGENIERA AMBIENTAL**

**TEMA:  
EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD BACTERIANA PARA  
REMOVER PLOMO EN AGUAS RESIDUALES SINTÉTICAS**

**AUTORES:  
SANTIAGO PAÚL GUERRA GUEVARA  
GABRIELA ALEJANDRA REINOSO MOLINA**

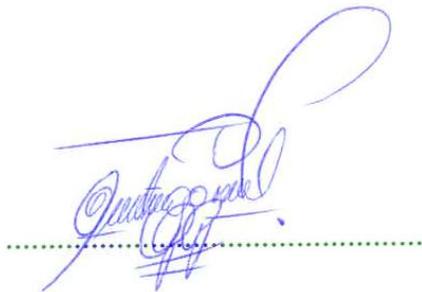
**TUTOR:  
LENIN JAVIER RAMÍREZ CANDO**

**Quito, marzo de 2016**

## CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotros, Santiago Paúl Guerra Guevara con documento de identificación N° 171701364-1 y Gabriela Alejandra Reinoso Molina con documento de identificación N° 172668982-9, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: Evaluación in vitro de la capacidad bacteriana para remover plomo en aguas residuales sintéticas, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero e Ingeniera Ambiental, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Santiago Paúl Guerra Guevara

C.I 171701364-1



Gabriela Alejandra Reinoso Molina

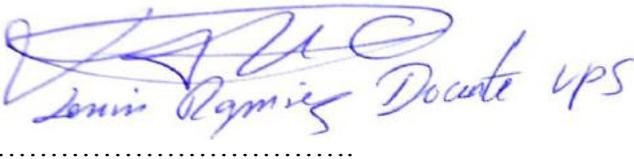
C.I 172668982-9

Quito, marzo del 2016

## DECLARATORIA DE COAUTORÍA DEL DOCENTE TUTOR

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, Evaluación in vitro de la capacidad bacteriana para remover plomo en aguas residuales sintéticas, realizado por los estudiantes Santiago Paúl Guerra Guevara y Gabriela Alejandra Reinoso Molina, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo de 2016



.....

Lenin Javier Ramírez Cando

C.I:1104250426

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1. ....	3
1.1.    Objetivos .....	3
1.1.1.  Objetivo general .....	3
1.1.2.  Objetivos específicos.....	3
1.2.    Hipótesis.....	4
1.2.1.  Hipótesis nula .....	4
1.2.2.  Hipótesis alternativas .....	4
CAPÍTULO 2. ....	5
MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.    Características de las bacterias .....	5
2.1.1.  Generalidades .....	5
2.1.2.  Aplicaciones industriales de las bacterias .....	6
2.2.    Biorremediación .....	7
2.2.1.  Biorremediación con bacterias .....	7
2.2.2.  Tipos de biorremediación con bacterias .....	9
2.3.    Ventajas de la biorremediación frente a otras técnicas de remediación .	11
2.4.    Cinética bacteriana .....	12
2.4.1.  Curva de crecimiento.....	12
2.4.2.  Modelo matemático de la cinética de la curva de crecimiento bacteriano. ....	14
2.5.    Técnicas utilizadas .....	16
2.5.1.  Pruebas bioquímicas .....	16

2.5.2.	Kit Microgen GN-ID .....	16
2.5.2.	Nefelometría o Turbidimetría .....	17
2.5.3.	Absorción atómica .....	18
CAPÍTULO 3. ....		20
MATERIALES Y MÉTODOS .....		20
3.1.	Materiales .....	20
3.1.1.	Muestreo .....	20
3.1.2.	Laboratorio .....	20
3.2.	Metodología.....	21
3.2.1.	Muestreo .....	21
3.2.2.	Aislamiento y bioestimulación de bacterias .....	22
3.2.3.	Tinción de Gram .....	23
3.2.4.	Caracterización bioquímica de bacterias .....	24
3.2.5.	Selección de las cepas bacterianas resistentes a altas concentraciones de Plomo.....	27
3.2.6.	Análisis de la cinética de crecimiento bacteriano.....	28
3.2.7.	Tratamiento estadístico de datos.....	30
CAPÍTULO 4. ....		31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		31
4.1.	Muestreo .....	31
4.2.	Aislamiento de bacterias a partir de colonias obtenidas.....	31
4.3.	Aislamiento y bioestimulación .....	32
4.4.	Descripción macroscópica y microscópica .....	33
4.5.	Caracterización bioquímica de bacterias .....	34

4.6.	Curvas de calibración .....	38
4.7.	Análisis de la cinética de crecimiento bacteriano y remoción de Pb .....	40
4.7.1.	Cepa 1. <i>Acinetobacter</i> sp (CdM201) .....	40
4.7.2.	Cepa 2. <i>Photobacterium damsela</i> e (Re04Pb2 (1) A) .....	45
4.7.3.	Cepa 3. <i>Pseudomonas</i> sp (LPS01Cr1).....	50
4.7.4.	Cepa 4. <i>Aeromonas hydrophila</i> M5Pb2 (2) A.....	55
4.7.5.	Cepa 5. <i>Aeromonas</i> sp LPS01Pb1 (2) A.....	61
4.8.	Discusión de resultados obtenidos .....	67
	CONCLUSIONES.....	70
	REFERENCIAS .....	73
	ANEXOS .....	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Técnica de agotamiento por estrías para el aislamiento de bacterias. ....	23
Figura 2. Curva de calibración para el crecimiento microbiano .....	38
Figura 3. Curva de calibración de la absorción atómica en función de la concentración de Pb .....	39
Figura 4. Curva de calibración de la absorción atómica en función de la concentración de Pb.....	39
Figura 5. Crecimiento bacteriano - <i>Acinetobacter sp.</i> .....	42
Figura 6. Remoción de Plomo - <i>Acinetobacter sp.</i> .....	41
Figura 7. Box plot de pH a 20 y 100 ppm - <i>Acinetobacter sp.</i> .....	44
Figura 8. Box plot de la temperatura interna del cultivo a 20 y 100 ppm - <i>Acinetobacter sp.</i> .....	45
Figura 9. Crecimiento bacteriano - <i>Photobacterium damsela</i> e (Re04Pb2 (1) A).....	47
Figura 10. Remoción de Pb - <i>Photobacterium damsela</i> e.....	47
Figura 11. Box plot para pH a 20 y 100 ppm - <i>Photobacterium damsela</i> e.....	49
Figura 12. Box plot para temperatura interna de cultivo- <i>Photobacterium damsela</i> e .....	50
Figura 13. Crecimiento bacteriano - <i>Pseudomona sp.</i> .....	52
Figura 14. Remoción de Pb - <i>Pseudomona sp.</i> .....	52
Figura 15. Box plot para pH a 20 y 100 ppm- <i>Pseudomona sp.</i> .....	52
Figura 16. Box plot para temperatura interna de cultivo a 20 y 100 ppm- <i>Pseudomona sp.</i> .....	55
Figura 17. Crecimiento bacteriano de <i>Aeromona hydrophila</i> .....	57
Figura 18. Remoción de Plomo - <i>Aeromona hydrophila</i> .....	58
Figura 19. Box plot de pH a 20 y 100 ppm - <i>Aeromona hydrophila</i> .....	59

Figura 20. Box plot de la temperatura interna del cultivo a 20 y 100 ppm - <i>Aeromona hydrophila</i> .....	61
Figura 21. Crecimiento bacteriano – <i>Aeromona sp</i> .....	63
Figura 22. Remoción de Plomo - <i>Aeromona sp</i> .....	64
Figura 23. Box plot de pH a 20 y 100 ppm - <i>Aeromona sp</i> .....	65
Figura 24. Box plot de la temperatura interna del cultivo a 20 y 100 ppm - <i>Aeromona sp</i> .....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales, equipos y reactivos.....	20
Tabla 2. Identificación de arginina.....	26
Tabla 3. Preparación de estándares McFarland.....	29
Tabla 4. Bacterias resistentes y sensibles al Pb.....	31
Tabla 5. Aislamiento de bacterias puras.....	32
Tabla 6. Resistencia al Pb y tiempo de crecimiento.....	33
Tabla 7. Morfología macroscópica, microscópica y tinción Gram.....	33
Tabla 8. Pruebas bioquímicas.....	34
Tabla 9. Identificación de las cepas bacterianas.....	36
Tabla 10. Correlación de Pearson - <i>Acinetobacter</i> sp.....	41
Tabla 11. Crecimiento bacteriano - <i>Acinetobacter</i> sp.....	41
Tabla 12. Correlación de Pearson <i>Photobacterium damsela</i> e.....	45
Tabla 13. Crecimiento bacteriano - <i>Photobacterium damsela</i> e.....	46
Tabla 14. Correlación de Pearson <i>Pseudomona</i> sp.....	51
Tabla 15. Crecimiento bacteriano - <i>Pseudomona</i> sp.....	51
Tabla 16. Correlación de Pearson - <i>Aeromona hydrophila</i> .....	56
Tabla 17. Crecimiento bacteriano de <i>Aeromona hydrophila</i> .....	56
Tabla 18. Correlación de Pearson - <i>Aeromona</i> sp.....	62
Tabla 19. Crecimiento bacteriano - <i>Aeromona</i> sp.....	62
Tabla 20. Resumen de crecimiento bacteriano a 20 y 100 ppm.....	67
Tabla 21. Resumen de remoción de Pb a 20 y 100 ppm.....	69

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Referencia de Sustratos Kit Microgen GN-ID A+B .....	80
Anexo 2. Carta de colores Kit Microgen GN-ID A+B .....	81
Anexo 3. Hojas de resultados Kit Microgen GN-ID A+B .....	82
Anexo 4. Curva de análisis de residuos. ....	84
Anexo 5. Pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para <i>Acinetobacter sp</i> .....	85
Anexo 6. Prueba U de Mann Whitney para <i>Acinetobacter sp</i> .....	85
Anexo 7. Prueba t de Student de la temperatura interna del cultivo para <i>Acinetobacter sp</i> .....	85
Anexo 8. Pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para <i>Photobacterium damsela</i> .....	85
Anexo 9. Pruebas U de Mann Whitney para <i>Photobacterium damsela</i> .....	86
Anexo 10. Prueba t de Student para <i>Photobacterium damsela</i> .....	86
Anexo 11. Pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para <i>Pseudomona sp</i> .....	86
Anexo 12. Pruebas U de Mann Whitney para <i>Pseudomona sp</i> .....	86
Anexo 13. Pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para <i>Aeromona hydrophila</i> .....	87
Anexo 14. Pruebas U de Mann Whitney para <i>Aeromona hydrophila</i> .....	87
Anexo 15. Prueba t de Student para <i>Aeromona hydrophila</i> .....	87
Anexo 16. Pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para <i>Aeromona sp</i> .....	87
Anexo 17. Pruebas U de Mann Whitney para <i>Aeromona sp</i> .....	88
Anexo 18. Pruebas t de Student para <i>Aeromona sp</i> .....	88

## RESUMEN

Con la finalidad de mitigar los impactos ambientales ocasionados por diferentes actividades industriales relacionadas con el sector minero, petroquímico, metalúrgico, entre otros, se ha realizado una caracterización *in vitro* de 152 microorganismos entre cepas y consorcios bacterianos. En la fase de aislamiento y bioestimulación las bacterias fueron sometidas a selección en medio de cultivo modificado, en el cual se adicionó concentraciones de 20 y 100 ppm de Pb, obteniendo finalmente cinco cepas que mostraron ser resistentes y/o tolerantes al Pb. La determinación de la capacidad bacteriana de remoción de Pb se experimentó a dos condiciones: incubación a temperatura controlada de 25°C e incubación a temperatura ambiente (entre 5°C y 23°C para la zona sur de Quito en los meses de estudio).

La caracterización bioquímica se realizó mediante el Kit Microgen GN-ID A+B, identificándose los siguientes géneros: *Acinetobacter*, *Pseudomona*, *Aeromona* y las especies: *Aeromona hydrophila* y *Photobacterium damsela*, la misma que obtuvo el 99,8% de certeza. En la elaboración de las curvas de cinética de crecimiento bacteriano y remoción de Pb, se utilizó técnicas de turbidimetría y absorción atómica, en donde *Aeromona hydrophila* presentó mayor facilidad de crecimiento a 20 ppm en incubación a temperatura ambiente, mientras que *Pseudomona sp* registró un porcentaje de remoción total de Pb del 96,30% a 100 ppm e incubación a temperatura ambiente.

La investigación pretende servir de guía para futuros estudios de manera que pueda ser empleada como una alternativa de remediación más eficiente y económica en relación a las tecnologías de remediación convencionales.

## ABSTRACT

In this study it has been performed an *in vitro* characterization of 152 strains and microbial consortia, in order to mitigate the environmental impacts of different industrial activities related to mining, petrochemical and metallurgical sector.

In isolation and biostimulation phase, bacteria were put through a selection in modified crop, in which 20 and 100 ppm lead concentrate was added, finally obtaining five strains that were shown to be resistant and/or tolerant to Pb. Determination of bacterial removal capacity of lead was experienced under two conditions: incubation at controlled temperature of 25°C and incubation at room temperature (between 5°C and 23°C for the southern area of Quito in the months of study).

The biochemical characterization of bacteria was performed using Microgen GN-ID A + B System, identifying the following genera: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromona* and species: *Aeromona hydrophila* and *Photobacterium damsela*, it which obtained a percentage of 99.8% of certainty. During the elaboration of the curves of kinetic bacterial growth and Pb remotion, turbidimetry and atomic absorption techniques were used, where *Aeromona hydrophila* showed a greater ease of growth at a 20 ppm concentration in incubation at room temperature, while *Pseudomona sp* registered a total removal percentage of 96.30% with a 100 ppm concentration and room temperature incubation.

This research is intended as a guide for future studies, so that it can be used as an alternative for more efficient and cheaper remediation regarding conventional remediation technologies.

## INTRODUCCIÓN

Los adelantos industriales y tecnológicos de las últimas décadas han ocasionado graves problemas de contaminación ambiental. Según Eróstegui (2009) las principales industrias responsables de la emisión de metales pesados al ambiente son las industrias minera, petroquímica y metalúrgica.

Las actividades mineras, “pueden producir una contaminación localizada de metales, principalmente en el suelo y agua donde presentan concentraciones elevadas de cobre, plomo, arsénico, selenio, hierro y cadmio” (Turcios & García, 2010, pág. 19). Los procesos de minería que tienen mayor afectación sobre el ambiente son: la extracción de las menas, el procesado preliminar, la evacuación de residuos y transporte de productos semi-procesados y productos terminados (Acosta, Cárdenas, & Martínez, 2012; Martínez, 2010). La utilización de bacterias para remediar estos ambientes contaminados y la búsqueda de una mejora continua en cada uno de los procesos mineros, son alternativas que reducirían de manera significativa los impactos ocasionados por esta industria.

Por otra parte García, Castells, & Gaya (2012) señalan que la industria petroquímica ha sido considerada como potencialmente peligrosa, debido a los graves riesgos asociados a sus actividades, accidentes de barcos petroleros de gran tonelaje y a los vertidos ocasionados por la limpieza y mantenimiento de sentinas. Entre las consecuencias directas podemos mencionar los daños a la vida marina y a los ecosistemas terrestres, los mismos que repercuten de manera negativa en las actividades económicas de las zonas afectadas (Greenpeace, 2008). En algunos casos los daños

ocasionados al ambiente se pueden considerar irreversibles, es decir, cuando el daño cubre grandes extensiones de terreno y la remediación es muy complicada o costosa y afecta de manera considerable a las especies animales y vegetales, llegando inclusive a poner en riesgo su existencia.

Como lo mencionan Bustos, Garzón, & Tamayo (2015) el sector metalúrgico tiene cuatro tipos de contaminación ambiental: emisiones atmosféricas, residuos sólidos, emisiones líquidas y ruidos. La generación de residuos sólidos para Ambuludi & Hoyos (2013) es considerada como la que mayor contaminación produce, debido a que en los diferentes procesos metalúrgicos se generan residuos de metales pesados como plomo, níquel, cobre, zinc, mercurio, arsénico y cadmio, los cuales pueden acumularse en los organismos de seres vivos.

La pregunta que pretende responder el presente trabajo es; ¿Cómo mitigar los impactos ambientales ocasionados por las diferentes actividades industriales utilizando la biorremediación con bacterias como una herramienta de investigación y aplicación industrial, de modo que, se pueda reducir de manera significativa la contaminación ambiental en nuestro país?

Para este fin, la presente investigación se ha llevado a cabo en la Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, en los laboratorios de las carreras de Ingeniería Ambiental e Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales; en cuanto a las muestras de agua residual utilizadas para realizar los experimentos, fueron obtenidas de las industrias: minera, petroquímica y metalúrgica, las mismas que se encuentra ubicadas en la región costa del país, pero debido a convenios con las industrias no se revelará ni su ubicación ni el nombre.

## **CAPÍTULO 1.**

### **1.1. Objetivos**

#### **1.1.1. Objetivo general**

Evaluar *in vitro* la capacidad bacteriana para remover plomo en aguas residuales sintéticas.

#### **1.1.2. Objetivos específicos**

Aislar y caracterizar morfológicamente bacterias presentes en muestras de agua residual.

Seleccionar las bacterias que logren adaptarse al medio de cultivo utilizando plomo a concentraciones de 20 y 100 ppm.

Identificar bioquímicamente las bacterias resistentes al plomo.

Determinar la cinética de crecimiento y la curva de remoción total de plomo en aguas residuales sintéticas.

## **1.2. Hipótesis**

### **1.2.1. Hipótesis nula**

H0: Las bacterias aisladas remueven el plomo de aguas residuales sintéticas.

### **1.2.2. Hipótesis alternativas**

H1: Las bacterias aisladas no remueven el plomo de aguas residuales sintéticas.

H2: Las bacterias aisladas remueven parcialmente el plomo de aguas residuales sintéticas.

## **CAPÍTULO 2.**

### **MARCO TEÓRICO**

En el presente capítulo se abordarán temas relacionados a la biorremediación ambiental con bacterias y su aplicabilidad para remediar ambientes contaminados con metales pesados, así como también, se menciona algunos ejemplos de organismos capaces de degradar y almacenar compuestos tóxicos en su estructura. Los tipos de biorremediación como: biolixiviación, biosorción, bioacumulación y biomineralización son otra parte importante que se tratará más adelante; La cinética de crecimiento bacteriano, las diferentes técnicas utilizadas y se explicará también las ventajas de la biorremediación frente a otras técnicas de remediación y su importancia a nivel económico y ecológico.

#### **2.1. Características de las bacterias**

##### ***2.1.1. Generalidades***

Las bacterias son microorganismos formados por una única célula denominada procariota, debido a que su material genético no se encuentra cubierto por una membrana nuclear (Tórtora, Funke, & Case, 2007). En su defecto, “están cubiertas por paredes celulares que en gran parte están constituidas por un complejo de hidrato de carbono y proteína denominado peptidoglicano” (Prescott, Harley, & Klein, 2008), lo que las diferencia de las paredes celulares de plantas las cuales se encuentran constituidas por celulosa.

Las bacterias varían en tamaño, forma y características celulares y genéticas; como mencionan Rogers (2011) y Tórtora et al. (2007) éstas se clasifican en: bastones como

los bacilos, esféricas u ovals como los cocos y curvas como los vibrios y los espirilos; las bacterias a su vez pueden formar pares, cadenas u otros agrupamientos. Estos microorganismos viven en el suelo, aire y agua, en ambientes con valores extremos de temperatura, pH o salinidad, algunas causando enfermedades o muchas de estas desempeñando papeles beneficiosos dentro de los ciclos de los elementos de la biosfera (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009; Prescott et al., 2008). Varias especies de bacterias en la actualidad están siendo utilizadas en actividades biotecnológicas favorables como la producción de vitaminas, degradación de compuestos orgánicos complejos y tóxicos tanto naturales como sintéticos.

### ***2.1.2. Aplicaciones industriales de las bacterias***

Las características que debe tener un microorganismo para ser considerado útil a nivel industrial son producir la sustancia de interés, estar disponible en cultivo puro, debe ser genéticamente estable, crecer en cultivos a gran escala, crecer rápidamente y producir el producto deseado en cortos periodos de tiempo, crecer en un medio de cultivo barato y disponible en grandes cantidades y no debe ser patógeno (Morales, 2012).

Existen múltiples aplicaciones industriales de las bacterias, como explican Castillo & Barragán (2011) en la industria alimentaria algunas bacterias lácticas: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*, pueden preservar y conservar las características organolépticas de los alimentos (Ramírez, Ulloa, Velázquez, Ulloa, & Arce, 2011); en el caso de la industria farmacéutica los géneros: *Streptomyces*, *Bacillus*, *Streptomyces*, se puede incorporar a principios activos para

originar nuevos medicamentos y antibióticos; en la industria de plásticos y papel se desea mejorar los productos, procesos y crear nuevas tecnologías amigables con el ambiente, por ejemplo *Alcaligenes* puede ser utilizada en la fabricación de bioplásticos; en la depuración de aguas residuales en fangos activados son de gran utilidad las bacterias aerobias y finalmente en la biodegradación de xenobióticos las *Pseudomonas* son empleadas en la biodegradación de hidrocarburos y algunos metales pesados.

## **2.2. Biorremediación**

Sánchez & Rodríguez (2010) en su artículo Fundamentos y aspectos microbiológicos, definen a la biorremediación como un conjunto de técnicas basadas en el potencial metabólico de los microorganismos, específicamente su capacidad para degradar total o parcialmente una amplia gama de compuestos, con el objetivo de limpiar ambientes contaminados. Los microorganismos a ser utilizados, como lo menciona Volke (2002) pueden ser plantas, hongos, bacterias; los cuales sirven para degradar, transformar o remover compuestos tóxicos a productos metabólicos menos tóxicos.

### **2.2.1. Biorremediación con bacterias**

“Debido a su capacidad de adaptación las bacterias han desarrollado varios mecanismos para obtención de energía, complejos enzimáticos” (Ramírez & Coba, 2012, pág. 16), así como resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver & Phung, 2005). Entre ellos se encuentran principalmente los que involucran: i) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad, ii) enzimas que modifican el estado de óxido-reducción de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas e insolubles, y iii) transportadores

de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Cervantes et al., 2006). Las bacterias han sido objeto de numerosos estudios, debido a, tal como lo determinan Suárez & Reyes (2002) y Peña & Vanegas (2010) su participación en los ciclos biogeoquímicos de elementos esenciales (C, N, S y P) y de sus minerales asociados; así como por su facilidad de propagación, acelerado metabolismo y capacidad para transformar compuestos no esenciales que pueden representar una amenaza para el ambiente.

Torres (2003), menciona la capacidad de algunas bacterias de los géneros *Pseudomona*, *Xanthomonas*, *Ferroxidans*, *Ralstonia*, *Acidobacillus*, entre otras, como agentes biorremediantes, ya que éstas son capaces de extraer metales de sustratos sólidos, ser utilizadas como bioabsorbentes para la recuperación de metales y para el tratamiento de efluentes industriales (Suárez & Reyes, 2002). Las interacciones entre bacterias y metales pueden ocurrir a nivel extracelular e intracelular; a nivel extracelular se determina la movilización e inmovilización de metales, como lo indica Suárez & Reyes (2002) la movilización del metal se refiere a la transición de un estado insoluble inicial (correspondiente a una fase sólida) a un estado soluble final, en fase acuosa, mientras que “la inmovilización del metal, es el pasaje de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida” (Soto, Gutiérrez, Rey León, & González, 2010, pág. 196). Por otro lado, a nivel intracelular, como consecuencia de la acumulación del metal ocurren transformaciones enzimáticas.

La capacidad del género *Pseudomona* para degradar compuestos tóxicos según Torres (2003) depende del tiempo de contacto con el compuesto, las condiciones ambientales y su versatilidad fisiológica, siendo consideradas como uno de los géneros más eficientes

al momento de degradar contaminantes. Por otro lado, Vullo (2003, pág. 98) sostiene que las bacterias del género *Ralstonia* pueden “acumular metales pesados previa solubilización de los mismos mediante la liberación de sideróforos. Los sideróforos son péptidos con capacidad complejante que son liberados al medio con el objeto de captar Fe, que es utilizado como oligoelemento dentro del metabolismo celular”. Estas características de eficiencia y capacidad de degradación de compuestos tóxicos promueven la aplicabilidad de técnicas de biorremediación.

## **2.2.2. Tipos de biorremediación con bacterias**

### **2.2.2.1. Biolixiviación**

La biolixiviación según Lock (2009, pág. 25) “es una metodología de solubilización de minerales a partir de matrices complejas utilizando la acción directa o indirecta de microorganismos”. Por intermedio de la acción microbiana, los metales presentes en los minerales resultan extraídos en fase acuosa. Tal es el caso, como menciona (Vullo, 2003, pág. 97) “la obtención de Cu por la oxidación de las menas de  $\text{Cu}_2\text{S}$  (calcocita) a  $\text{CuSO}_4$  por intermedio de la acción de las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*”.

### **2.2.2.2. Biosorción**

“La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, zinc y cobre” (Vullo, 2003, pág. 99). El término biosorción, se utiliza para referirse a la captación de metales mediante la transferencia selectiva de uno o más solutos de una fase líquida a un lote de

partículas sólidas de material biológico a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico (Acosta et al., 2012; Vizcaíno & Fuentes, 2015). Debido al origen natural de los sustratos y a la eliminación de lodos residuales durante el proceso de remoción, como lo mencionan Vizcaíno & Fuentes (2015), esta alternativa se constituye en un sistema que permite no sólo remover el metal contaminante disminuyendo el impacto ambiental generado sobre el medio en el cual se descarga, sino que además permite recuperarlo para integrarlo a un nuevo ciclo productivo. Es por esto que existe una creciente búsqueda de microorganismos que sean utilizados como biosorbentes para incrementar la captación de metales pesados.

#### 2.1.2.3. Bioacumulación

La bioacumulación como lo describe Prieto, Gonzáles, Román, & Prieto (2009, pág. 29) “es un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo vivo en un cierto plazo de tiempo”. Por otra parte Vullo (2003) se refiere a la bioacumulación como un mecanismo celular en el cual interviene un sistema de transporte de membrana, que se encarga de internalizar los metales del entorno celular incorporándolos al citoplasma, o como en el caso de los hongos, el metal puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola. En su estudio (Sala et al., 2010) determinaron que las especies *Absidia orchidis* y *Ascophyllum sp*, poseen una excelente capacidad para acumular plomo en sus sistemas, esto nos demuestra la importancia ecológica que tienen estos organismos al momento de remediar ambientes contaminados.

#### 2.1.2.4. Biomineralización

Es el proceso mediante el cual un organismo ya sea procariota, eucariota incluyendo humanos producen minerales, Pérez, Jiménez, & Valverde (2004) explican que los microorganismos son el segundo grupo en importancia en la formación de minerales, existen dos procesos de biomineralización: la mineralización controlada biológicamente (BCM) y la mineralización inducida biológicamente (BIM), que pueden generar una gran variedad de minerales diferentes. Según Gadd (2000) también se puede precipitar metales mediante la formación de sulfuros y fosfatos, “un ejemplo de esto es la precipitación de sulfuros metálicos en reactores con cultivos mixtos de bacterias reductoras de sulfato o la acumulación de CdS en la pared celular de las bacterias *Klebsiella planticola* y *Pseudomonas aeruginosa*” (Vullo, 2003, pág. 99)

### 2.3. Ventajas de la biorremediación frente a otras técnicas de remediación

Una de las principales ventajas de la biorremediación como lo explican Sánchez & Rodríguez (2010, pág. 12) se debe a que “esta tecnología utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (fundamentalmente bacterias, pero también hongos y levaduras) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples y poco o nada contaminantes”, adicionalmente González (2011) explica que la biorremediación también se puede utilizar para limpiar terrenos o aguas contaminadas con el uso de recursos económicos más bajos que otras técnicas convencionales.

Como lo describe Safont (2012, pág. 7) otra de las ventajas de la biorremediación “es que es una tecnología poco intrusiva en el medio ambiente y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos dignos de destacar”, y hablando en términos

comparativos, es económica. “Los costos de la biorremediación se encuentran entre 100 y 250 USD/m<sup>3</sup>, mientras que las tecnologías convencionales, como la incineración o rellenos sanitarios seguros pueden costar entre 250 y 1000 USD/m<sup>3</sup>” (Volke, 2002). Debido a esto la biorremediación se convierte en una alternativa muy viable y eficaz, ya que algunos microorganismos son capaces de tolerar y degradar compuestos de gran toxicidad a bajo costo.

## **2.4. Cinética bacteriana**

### **2.4.1. Curva de crecimiento**

Según Tórtora y colaboradores (2007) y Dos Santos (2007) se define crecimiento bacteriano al aumento en el número de células o de masa celular por unidad de tiempo de una población que se agrupa en miles de millones de células. Cuando los microorganismos se reproducen mediante procesos como la fisión binaria el crecimiento conlleva un aumento del número de células, sin embargo también se produce crecimiento cuando las células simplemente aumentan de tamaño o se alargan (Prescott et al., 2008). El incremento del número de células es estudiado mediante el análisis de la curva de crecimiento de un cultivo microbiano que representa gráficamente el logaritmo del número de células viables frente al tiempo de incubación; en la curva de crecimiento se diferencian cuatro fases: fase de latencia, fase de crecimiento exponencial o logarítmico, fase estacionaria y la fase de muerte celular (Prescott et al., 2008).

#### **2.4.1.1. Fase de latencia**

Cuando se introducen microorganismos en un medio de cultivo nuevo no se produce un aumento debido a que las células no se reproducen de inmediato (Tórtora et al.,

2007). A pesar de esto las células no se mantienen inactivas ya que se encuentran en intensa actividad metabólica sintetizando nuevas enzimas y moléculas (Prescott et al., 2008) La duración de la fase de retraso depende considerablemente del estado de los microorganismos y de las propiedades del medio.

#### *2.4.1.2. Fase de crecimiento exponencial*

En esta fase las células comienzan a dividirse y entran en un periodo de crecimiento en donde la reproducción celular alcanza su máxima actividad durante un periodo de tiempo que puede ser corto o prolongado basado en factores como los recursos disponibles en el medio, entre otros (Madigan et al., 2009; Tórtora et al., 2007). En esta fase las células se encuentran en un estado fisiológico ideal para estudios enzimáticos y estructurales, sin embargo estas son mucho más sensibles a condiciones adversas

#### *2.4.1.3. Fase estacionaria*

La fase estacionaria es un periodo de equilibrio, en donde en determinado momento la tasa de crecimiento disminuye, la actividad metabólica se torna más lenta y el número de muertes microbianas compensa el número de células nuevas (Tórtora et al., 2007). Por su parte (Madigan et al., 2009) alude que durante esta fase no hay aumento ni descenso en el número de células, sin embargo muchas funciones celulares continúan como el metabolismo energético y procesos biosintéticos.

#### *2.4.1.4. Fase de muerte celular*

Al final del crecimiento el número de muertes supera el número de nuevas células y la población entra en una fase de muerte y en algunos casos se produce una lisis celular

real (Madigan et al., 2009). Cabe recalcar que las fases de la curva de crecimiento ocurren a nivel poblacional no en células individuales.

#### ***2.4.2. Modelo matemático de la cinética de la curva de crecimiento bacteriano.***

En el libro Microbiología, publicado en 2008 por Prescott y colaboradores, se definieron varias fórmulas para determinar el número de población en un tiempo  $t$ , en donde el aumento de la población es siempre  $2^n$ , siendo  $n$  el número de generaciones. El aumento poblacional es exponencial o logarítmico.

Para el análisis de los resultados de la curva de crecimiento se expresan con las siguientes ecuaciones:

$$N_t = N_0 \times 2^n \quad (1)$$

Donde  $N_0$  = número inicial de células (población inicial)

$N_t$  = Población en el tiempo  $t$

$n$  = número de generaciones en el tiempo  $t$

#### *Número de generaciones*

Empleando logaritmos de base decimal, se puede despejar  $n$ , (número de generaciones)

$$\log N_t = \log N_0 + n \cdot \log 2, y \quad (2)$$

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2} \quad (3)$$

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{0.301}$$

*Constante de velocidad media de crecimiento*

Durante la fase exponencial de un cultivo la velocidad de crecimiento puede ser expresada en función de la **constante de velocidad media de crecimiento ( $k$ )**, la cual representa el número de generaciones por unidad de tiempo expresado en generaciones por hora:

$$k = \frac{n}{t} = \frac{\log N_t - \log N_0}{0.301t} \quad (4)$$

*Tiempo de generación*

En su libro *Introducción a la Microbiología*, (Tórtora et al., 2007) define al tiempo de generación ( $g$ ) como el tiempo necesario para que la población bacteriana se divida, es decir se duplique. Para esto se toma en cuenta que si la población se duplica ( $t=g$ ), entonces:

$$N_t = 2N_0 \quad (5)$$

Reemplazando  $2N_0$  en la ecuación (4) y despejando  $k$ , se obtiene:

$$k = \frac{\log(2N_0) - \log N_0}{0.301g} \quad (6)$$

$$k = \frac{\log 2 + \log N_0 - \log N_0}{0.301g}$$

$$k = \frac{1}{g} \quad \therefore \quad g = \frac{1}{k} \quad (7)$$

Por tanto, el tiempo de generación es la inversa de la constante de la velocidad media de crecimiento.

## **2.5. Técnicas utilizadas**

### **2.5.1. Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas nos permiten identificar a las bacterias mediante un análisis de sus características metabólicas, como lo explican Bou y colaboradores (2011) algunas pruebas son técnicas y rápidas, ya que su lectura puede variar entre unos segundos hasta unas pocas horas y evalúan únicamente la presencia de una enzima preformada. Otras pruebas para sus lecturas requieren una incubación previa de 18 a 48 horas, es decir, requieren crecimiento microbiano para poder realizar la lectura, en este tipo de pruebas se detecta el componente metabólico o la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivos en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar.

### **2.5.2. Kit Microgen GN-ID**

El sistema Microgen GN-ID utiliza 24 (GN A+B) sustratos bioquímicos estandarizados en pocillos que han sido seleccionados en función de análisis informáticos, las tiras GN A han sido diseñados para identificar fermentadores de glucosa oxidasa negativos, nitrato positivos que incluyen los géneros más comunes de la familia *Enterobacteriaceae*. Las tiras GN A y GN B se utilizan de manera conjunta obteniendo un sistema de 24 sustratos para identificar bacilos no exigentes Gram negativos

(oxidasa negativos y positivos) además de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Los sustratos deshidratados en cada pocillo se reconstituyen con una solución salina del organismo a identificar. Si los sustratos son metabolizados por el organismo, se observará un cambio de color durante la incubación o después de la adición de reactivos específicos (Ver Anexo 1). Para identificar el organismo analizado se debe utilizar el Software Microgen Identification (MID-60) (Microgen Products, 2007, pág 3).

### **2.5.2. Nefelometría o Turbidimetría**

Según la American Water Works Association (2002) la nefelometría es un método que se utiliza para medir la turbidez de un medio de cultivo líquido al relacionarlo con el control estéril mediante un turbidímetro o nefelómetro (Riverón et al., 2012). Este método se basa en la comparación de la luz dispersada por la muestra en condiciones definidas y la dispersada por una solución patrón de referencia en idénticas condiciones, cuanto mayor es la intensidad de la luz dispersada, más intensa es la turbidez, es decir la luz absorbida es directamente proporcional a la concentración de células existentes en el cultivo (American Water Works Association, American Public Health Association, & Water Pollution Control Federation, 1992; Riverón et al., 2012). Como suspensión patrón de turbidez de referencia se emplea la suspensión del polímero formacina como equivalente a 40 unidades nefelométricas (NTU).

Para evitar interpretaciones erróneas la American Water Works Association (2002) ha considerado tres factores: el diseño del instrumento, el material usado para calibrarlos y

la técnica utilizada para hacer la medida; sin embargo es difícil de establecer la correlación de la turbidez con la concentración en peso de la materia en suspensión ya que intervienen el tamaño, la forma y el índice de refracción de las partículas (American Water Works Association et al., 1992). Debido a la precisión, a la sensibilidad y su fácil aplicación el método nefelómetro ha sido más utilizado para medir turbidez.

Para el cálculo de turbidez por el método nefelométrico se toma en cuenta la fórmula (8).

$$Turbidez = \frac{A \times (B+C)}{c} \quad (8)$$

Dónde:

A= NTU encontradas en muestra diluida.

B= volumen (ml) de agua de dilución

C= volumen (ml) de la muestra tomada para dilución.

### **2.5.3. Absorción atómica**

La espectroscopia de absorción atómica (EAA) consiste principalmente en la absorción de radiación de una longitud de onda determinada, esta radiación es absorbida selectivamente por átomos con diferentes niveles energéticos, cuya diferencia en energía está dada por el valor de la energía de los fotones incidentes. La cantidad de fotones absorbidos está determinada por la ley de Beer, la misma que relaciona la pérdida del poder radiante, con la concentración de la especie absorbente y con el espesor de la celda que contiene los átomos absorbentes (Rocha, 2000, pág. 4)

Por su parte Skoog (2001), en su libro Principios de análisis instrumental considera dos métodos espectrométricos ópticos atómicos, El primero es la espectrometría de absorción atómica (AAS), que ha sido el más utilizado durante casi medio siglo para determinar elementos en muestras analíticas, y el segundo método corresponde a la espectrometría de fluorescencia atómica (AFS) que debido a su casi nula comercialización su uso no ha sido generalizado en el análisis rutinario de elementos. La principal aplicación de la espectroscopia de absorción atómica consiste en determinar de una manera cuantitativa más de 60 elementos metálicos o metaloides, mientras que para los elementos no metálicos se debe emplear espectrofotómetros al vacío, debido a que sus líneas de resonancia se localizan por debajo de los 200 nm.

## CAPÍTULO 3.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Muestreo

Para la toma de muestras se utilizaron los siguientes materiales: balde, bolsas plásticas, marcadores, hojas para identificar, detergente, caja conservadora, frascos de vidrio estéril.

##### 3.1.2. Laboratorio

En la Tabla 1 se muestran los materiales, equipos y reactivos que fueron utilizados para el desarrollo del proyecto.

Tabla 1.

Materiales, equipos y reactivos

Materiales	Equipos	Reactivos
Vasos de precipitación de 500, 250 y 100 ml	Microscopio Micros Austria	Agar Cetrimida
Balón volumétrico de 500 ml	Cámara de flujo laminar N-BIOTEK	Cristal violeta, lugol, alcohol cetona y safranina
Matraz aforado de 500 ml	Incubadora Memmert SNB-400	Plomo estándar de 1000 ppm
Pipetas graduadas de 100-1000 µl y 50-500 µl	pH metro digital Mettler Toledo	Aceite de inmersión
Pipeta Pasteur	Balanza analítica Denver Instrument	Alcohol
Probetas	Plancha de calentamiento	Agua destilada
Asas de siembra	Cámara fotográfica	Sulfato ferroso
Cajas Petri	Autoclave N-BIOTEK 1080	Cloruro de amonio
Varillas acodadas o espátulas Drigalsky	Equipo de absorción atómica VARIAN	Extracto de levadura
Papel aluminio	Turbidímetro Lovibond Water Testing TB 210 IR	Cloruro de bario
Parafilm	Termómetro	Ácido sulfúrico

Continuación Tabla 1

Kit para pruebas bioquímicas  
Microgen GN-ID

Higrómetro Sper Scientific  
800013

---

Nota: S. Guerra y G. Reinoso.

## **3.2. Metodología**

### **3.2.1. Muestreo**

Previo a la toma de muestras, se debió identificar las zonas o industrias más idóneas de conformidad con el proyecto, para lo cual se realizó consultas digitales y adicionalmente se inició con la revisión bibliográfica.

Una vez determinadas las zonas a muestrear, se tomó las muestras de los diferentes efluentes de aguas residuales, utilizando el método de muestreo aleatorio simple. La muestra se tomó lejos de la orilla intentando no remover el fondo, se colocó el frasco en posición invertida, luego se sumergió completamente y se desplazó el mismo en sentido contrario a la corriente.

Posteriormente las muestras se transportaron en cadena de frío a los laboratorios de las carreras de Ingeniería Ambiental e Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales de la Universidad Politécnica Salesiana. El etiquetado se lo realizó manualmente, con un código (según el tipo de agua y lugar en que fue tomada la muestra) y fecha, la estandarización de las muestras se efectuó mediante una mezcla dinámica, con agitación moderada durante 10 minutos y posteriormente fueron almacenadas en la incubadora a temperatura ambiente.

### **3.2.2. Aislamiento y bioestimulación de bacterias**

#### *3.2.2.1. Siembra de muestras en agar Cetrimida modificado*

El medio de cultivo se preparó con la siguiente mezcla: 33.975 g de Agar Cetrimida aforado a 750 ml de agua destilada estéril, y se añadió 15 ml de estándar de plomo de 1000 ppm equivalente a 20 ppm de plomo, luego se calentó moderadamente la mezcla a temperaturas de 70-80°C, agitándola constantemente hasta hacerla hervir durante 1 minuto, una vez preparada la mezcla se la esterilizó en Autoclave N-BIOTEK 1080 a 121°C por 20 min.

Posteriormente se inoculó 1ml y 0,1 ml de cada muestra en cajas Petri previamente esterilizadas utilizando la técnica de siembra por inmersión, se dispensó el medio de cultivo aproximadamente a 40° C y se homogenizó la muestra con el medio. Cada caja Petri se etiquetó con los datos de concentración, código de la muestra de agua más el metal empleado y fecha.

#### *3.2.2.2. Aislamiento de bacterias a partir de colonias obtenidas*

Una vez homogenizada la muestra con el medio de cultivo, las placas se incubaron por 48 horas a 25° C en una incubadora Memmert SNB-400. A continuación se revisó y contabilizó las unidades formadoras de colonia (UFCs) y se separó las colonias que presentaron diferentes morfologías, el aislamiento bacteriano se realizó mediante la resiembra de colonias obtenidas con la técnica de agotamiento por estrías en placa de agar Cetrimida como se muestra en la Figura 1 y se incubaron bajo las mismas condiciones.



Si no se denotaba cultivos puros en el crecimiento de UFCs, se aplicaba reiteradamente el proceso de agotamiento por estrías en nuevas cajas, hasta llegar a obtener una morfología uniforme. Las cepas consideradas como un cultivo puro se refrigeraron a 4°C y se las empaquetaron en papel aluminio, para obtener un cepario que permitirá continuar con la experimentación.

### 3.2.3. *Tinción de Gram*

A partir de los inóculos preparados, se realizó un frotis en placas de cada uno de éstos y se fijó la muestra utilizando la llama de un mechero. Inicialmente se agregó azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y se esperó un minuto, al cabo de este tiempo se enjuagó con agua destilada. A continuación se adicionó lugol, se esperó un minuto aproximadamente, y de la misma manera se enjuagó con agua destilada. Posteriormente se añadió alcohol cetona, se esperó 30 segundos y se enjuagó con agua destilada; por último se realizó la tinción de contraste agregando safranina y se esperó treinta segundos. Este tinte dejó de color rosado rojizo las bacterias Gram negativas, luego se lavó con agua destilada. Para realizar la descripción de las bacterias fue

conveniente hacerlo en el microscopio óptico ajustado a 100X de zoom, utilizando aceite de inmersión para mejorar la visibilidad.

### ***3.2.4. Caracterización bioquímica de bacterias***

#### ***3.2.4.1. Preparación del inóculo***

El inóculo se preparó con el kit de caracterización bioquímica The Microgen GN-ID A + B y se procedió según el manual del usuario detallado a continuación.

#### ***Procedimiento - inoculación e incubación***

1. Previamente se debió llevar a cabo una prueba de oxidasa en el aislado, donde se transfirió una colonia sobre la zona cuadrada de la tira con un asa de siembras, se esperó 30 segundos y se procedió a observar el color de la zona inoculada. La aparición de un color azul oscuro indicó prueba positiva, la ausencia de viraje evidente en los primeros 30 segundos indicó prueba negativa.
2. Se emulsionó una única colonia obtenida de un cultivo de 18 a 24 horas en 3-5 ml de solución salina estéril al 0.85% y se mezcló bien.
3. A continuación se retiró la lámina adhesiva de sellado de la tiras de ensayo de pocillos, pero no completamente, ya que se necesitaran más adelante.
4. Utilizando una pipeta Pasteur estéril, se añadió 3-4 gotas (aproximadamente 100 uL) de la suspensión bacteriana a cada pocillo de las tiras.
5. Después de la inoculación, en los pocillos 1,2 3 y 9 (Prueba de micropocillos GNA contando desde el extremo de la tira) y los pocillos 20 y 24 (Prueba de micropocillos GNB contando desde el pocillo 13) se colocó 3-4 gotas de aceite

mineral. (si el aislado es oxidasa positivo no se colocó aceite en el pocillo 20). Estos pocillos se encontraron marcados con un círculo negro alrededor del pocillo para facilitar su identificación.

6. Se selló la parte superior de las tiras con la cinta adhesiva y se incubó a 35-37 ° C. Las tiras GN A y GN B se leyeron después de 18-24 horas de incubación de enterobacterias, y después de 48 horas para aislados oxidasa positivos.

### ***Lectura y Adición de Reactivos***

#### **Tira GN A**

- i. Para la lectura se retiró la cinta adhesiva y se registró todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de colores (Anexo 2). Los resultados se registraron en los formularios previstos.
- ii. Añadir los reactivos apropiados para los siguientes pocillos:
  - a) Se añadió 2 gotas de reactivo de Kovac al pocillo 8, se leyó y registró los resultados después de 60 segundos. La formación de un color rojo indicó un resultado positivo.
  - b) Se colocó 1 gota de reactivo VP I y VP II respectivamente al pocillo 10 y se dejó reposar por 15-30 minutos para su posterior observación. La formación de un color rosa / rojo oscuro indicó un resultado positivo.
  - c) Se añadió 1 gota de reactivo TDA al pocillo 12 y se leyó después de 60 segundos. La formación de un color rojo cereza indicó un resultado positivo.

- iii. Para organismos oxidasa positivos, se realizó la prueba de reducción de nitrato en el pocillo 7 una vez que se haya leído y grabado el resultado ONPG. Se añadió 1 gota de reactivo de Nitrato A y Nitrato de B respectivamente al pocillo 7 y se leyó tras transcurrir 60 segundos. El cambio a color rojo indicó que el nitrato se había reducido a nitrito, pero si su color siguió siendo amarillo o incoloro después de la adición de reactivos de nitratos, se debió añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc. Esto indicó si el nitrato ha sido completamente reducido a nitrógeno gaseoso.

### **Tira GN B**

1. Se retiró la cinta adhesiva y se registró todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de colores (véase Anexo 2) y se apuntó los resultados en los formularios previstos.
2. Lectura de pocillos
  - i. El pocillo de gelatina (13) debió ser leído después de 18-24 horas para *Enterobacteriaceae* y después de 48 horas para oxidasa positivos aislados. Un resultado positivo de licuefacción de gelatina se identificó con la presencia de partículas negras a lo largo del pocillo.
  - ii. La arginina también se interpretó de manera diferente después de 24 horas y 48 horas de las incubaciones: (Ver Tabla 2).

Tabla 2.

Identificación de arginina

24 horas (Enterobacteriaceae)	48 horas (Organismos oxidasa positivos)
Amarillo = Negativo	Amarillo / Verde = Negativo
Verde / Azul = Positivo	Azul = Positivo

Nota: Adaptado de Microgen Products por: S. Guerra y G. Reinoso.

### ***Identificación***

El reporte de identificación Microgen GN-ID A+B se elaboró según el manual del usuario Microgen Biopruducts (2007), detallado a continuación:

Los sustratos han sido organizados en tripletes (conjuntos de 3 reacciones) con cada sustrato asignado un valor numérico (1, 2 o 4). La suma de las reacciones positivas para cada triplete formó un solo dígito del Código Octal que se utilizó para determinar la identidad del aislado. El Código Octal se introdujo en el software de Sistema de Identificación Microgen (MID-60), lo que generó un informe de los cinco organismos más probables en la base de datos seleccionada. El software proporcionó una identificación basado en la probabilidad y porcentaje de probabilidad con un análisis de la calidad de diferenciación. Para tener una definición completa de estos términos y una explicación de su utilidad en la interpretación se tomó como base el manual de ayuda del software (Microgen Biopruducts, 2007, pág 6)

#### ***3.2.5. Selección de las cepas bacterianas resistentes a altas concentraciones de Plomo***

Para la selección de las cepas bacterianas, se pesó 1 gramo de sulfato de sodio, 5 g de sacarosa 4 gramos de extracto de levadura, 20 ppm de Pb y se aforó a 1 litro y se dispensó 300 ml en cada matraz. El mismo procedimiento se lo realizó para la

concentración de 100 ppm de Pb. Posteriormente se inoculó cada cepa bacteriana en el medio de cultivo y se incubó a 22 °C durante 72 horas.

### ***3.2.6. Análisis de la cinética de crecimiento bacteriano***

#### *3.2.6.1. Factores Ambientales*

Se consideró como factores ambientales: viabilidad de crecimiento, temperatura, pH y como factor independiente la concentración de plomo. El inóculo se preparó con las bacterias aisladas presentes en las muestras obtenidas en los efluentes de agua residual, sin embargo, el experimento se realizó con aquellas bacterias que lograron adaptarse a concentraciones de 20 y 100 ppm de Pb.

#### *3.2.6.2. Preparación del medio de cultivo*

Para la preparación de medio de cultivo se tomó en cuenta concentraciones de 20 y 100 ppm de Pb.

Para preparar el medio de cultivo con 20 ppm de Pb se mezcló: 1 g de sulfato de sodio, 4 g de extracto de levadura, 5 g de sacarosa y se aforó a 1 litro de agua destilada, seguidamente se añadió 15 ml de estándar de plomo de 1000 ppm que equivalen a 20 ppm de Pb. A continuación se dispensó 300 ml de medio líquido en cada uno de los matraces con las cepas seleccionadas anteriormente.

Para la segunda concentración se mezcló: 1 g de sulfato de sodio, 4 g de extracto de levadura, 5 g de sacarosa, se aforó a 1 litro de agua destilada y se añadió 0,184 g de acetato de plomo que equivalen a 100 ppm de plomo y de la misma manera se procedió a dispensar 300 ml en cada uno de los matraces.

### 3.2.6.3. *Elaboración de la curva de calibración*

Para la elaboración de la curva de calibración se preparó los estándares McFarland del modo que se describe en la Tabla 3.

Tabla 3.

Preparación de estándares McFarland

Estándar No.	Curva de calibración		
	Ac. Sulfúrico (0.1%) (ml)	Cloruro de Bario (ml)	Equivalente en UFC/ml ( $\times 10^8$ )
1	9.9	0.1	3
2	9.7	0.3	9
3	9.5	0.5	15
4	9.3	0.7	21
5	9	1	30

Nota: Adaptado de Servicios Antimicrobianos por: S. Guerra y G. Reinoso.

Una vez preparados los estándares McFarland se tomaron las lecturas por triplicado de cada uno de los estándares y el blanco (agua destilada) con el turbidímetro Lovibond Water Testing TB 210 IR. Con esos datos se pudo obtener la ecuación que define el crecimiento bacteriano.

### 3.2.6.4. *Determinación de la curva de crecimiento*

Para determinar la curva de crecimiento se inoculó las cepas bacterianas en los matraces, homogenizándolas con una agitación moderada, para luego ser incubados a 22°C, la primera medición se realizó luego de 4 horas de iniciada la incubación. Para realizar la medición se tomó una alícuota del medio de cultivo previamente agitado, y se tomaron las lecturas con el turbidímetro ajustado a 860 nm.

Luego se midió consecutivamente la absorbancia de cada medio de cultivo inoculado en intervalos de 2 horas hasta que se obtuvo lecturas constantes de absorbancia en los medios de cultivo.

#### *3.2.6.5. Determinación de la curva de remoción*

Para determinar la curva de remoción se preparó medio de cultivo a 20 ppm y a 100 ppm de Pb como se indica en el apartado 3.2.6.2, se sembró las cepas seleccionadas con anterioridad en matraces por duplicado, y se tomaron mediciones de pH, temperatura y turbidez cada dos horas durante 4 días.

#### *3.2.7. Tratamiento estadístico de datos*

En el análisis de los resultados se utilizó diferentes pruebas estadísticas, entre ellas, el coeficiente de correlación de Pearson, que permitió determinar el grado de relación existente entre la linealización de la curva de crecimiento de UFC ( $\text{Log} [ ]$ ) y las variables: tiempo, temperatura interna del cultivo (TEMPT), pH y concentración de plomo. El análisis se realizó en 2 bloques; incubación a temperatura ambiente e incubación a temperatura controlada (25 °C).

Para conocer si los datos siguen una distribución normal (datos de pH y temperatura interna del cultivo) se utilizó la prueba de Normalidad de Shapiro Wilk, si el resultado de esta prueba era normal se aplicó la prueba estadística t-Student, (varianzas iguales) la misma que nos permitió determinar si existe o no una diferencia en promedio de los datos analizados y si el resultado no era normal se aplicó la prueba U de Mann Whitney para comprobar si el comportamiento de las dos variables es diferente.

## CAPÍTULO 4.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Muestreo

Se obtuvo un total de 16 muestras de agua residual de los efluentes procedentes de la industria minera, petroquímica y metalúrgica, de aproximadamente 1000 ml cada una, el agua presentó las siguientes características promedio: turbidez entre 600 y 900 NTU, oxígeno disuelto de 15 ppm, pH de 7, y una temperatura promedio entre 14 y 15 °C. La homogenización de las muestras se la efectuó mediante una mezcla dinámica, con una agitación moderada durante 10 minutos.

#### 4.2. Aislamiento de bacterias a partir de colonias obtenidas

Tabla 4.  
Bacterias resistentes y sensibles al Pb

Microorganismos	Cantidad	Resistentes	Sensibles	Proporción	Resis. Total
Bacterias aisladas	12	6	6	50,0%	3,9%
Consortios	140	37	103	26,4%	24,3%
Total	152	43	109		

Nota: S. Guerra y G. Reinoso.

Los resultados obtenidos en la Tabla 4 muestran una cantidad total de 12 bacterias aisladas, de las cuales seis cepas resultaron resistentes y/o tolerantes a las concentraciones de Pb ensayadas y seis cepas sensibles al Pb, es decir, que la proporción de bacterias aisladas resistentes es de un 50% y un 3.9% de bacterias resistentes con respecto al total de las colonias analizadas. Se obtuvo también una cantidad de 140 consorcios, de los cuales 37 resultaron resistentes al plomo (proporción del 26.4%), y 103 consorcios sensibles al plomo, con un total del 24.3% de resistencia con respecto al

total de las colonias analizadas. Para realizar el experimento se seleccionó cinco de las seis cepas resistentes al Pb debido a su desempeño.

### 4.3. Aislamiento y bioestimulación

Tabla 5.  
Aislamiento de bacterias puras

<b>Bacterias aisladas</b>		
<b>Análisis Microscópico</b>	<b>Análisis Macroscópico</b>	<b>Bacterias Puras</b>
LPS01Pb1(2)A	M1Cr1	M5Pb2(2)A
Re06Cr1(2)A	LPS01Cr2(2)B	LPS01As2(2)
Re06Cr1(2)B	LPS01Cr3A	CdM201
M1Cr1	M5Pb2(2)B	LPS01Cr1
LPS01Cd5(2)A	RE03Cr1(1)A	TDW01Cd1(1)A
Re04Pb2(1)A	M2As2(2)B	M2Cd1(2)A
Re03As1	CdM201	Re03AS1
Re03As1A	Re04Pb2(1)A	Re03AS1A
LPS01As2(2)	LPS01Cr1	M1Cr1
LPS01As1(1)	LPS01Pb1(2)A	M2As1
RE06Cd1B	Re03AS1A	Re04Pb2(1)A
TDW01Cd1(1)A	M5Pb2(2)A	LPS01Pb1(2)A
LPS01Pb1(2)B	Re03AS1	
LPS01Cr1	M5Pb1(1)A	
M2Cd1(2)A	LPS01As2(2)	
M2As01(2)A	M2As01(1)	
CdM201	LPS01Cr1(2)A	
LPS01Cr2(2)A	M2As2(1)	
M5Pb2(2)A	RE06Pb1	
LPS01Cr1(1)A	TDW01Cd1(1)A	
M2As1	M2Pb1B	
M5Pb2(2)B	M2Cd1(2)A	
LPS01As II 4	M5Pb2(2)B	
M2Pb1	M2As1	
<b>Total</b>	24	12

Nota: S. Guerra y G. Reinoso.

En la Tabla 5 se muestra os resultados del aislamiento de las 12 cepas bacterianas puras, que se obtuvieron al realizar el cruce de las 24 cepas puras en el microscopio y las 24 cepas puras según su morfología.

Tabla 6.  
Resistencia al Pb y tiempo de crecimiento.

Código	Resistencia al Pb		Tiempo de crecimiento
	20 ppm	100 ppm	
CdM201	+	+	48
Re04Pb2(1)A	+	+	48
M5Pb2(2)A	++	++	24
LPS01Cr1	++	++	24
LPS01Pb1(2)A	+	+	72

Nota: El símbolo (++) significa crecimiento bacteriano a 24 horas, (+) a 48 y 72 horas y el símbolo (-) denota ausencia de crecimiento bacteriano.

Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

En la Tabla 6 se puede observar las cepas de bacterias resistentes a concentraciones de plomo de 20 ppm y 100 ppm, los resultados muestran que las 5 cepas aisladas fueron capaces de tolerar el Pb a altas concentraciones, presentando un tiempo de crecimiento entre 24 y 72 horas.

#### 4.4. Descripción macroscópica y microscópica

Tabla 7.  
Morfología macroscópica, microscópica y tinción Gram

Código	Tinción Gram (+/-)	Descripción microscópica	Descripción macroscópica	Oxidasa
CdM201	Negativo	Bacilos aislados y cocobacilos formando en hileras	Colonias blanquecinas, forman una sola masa de aspecto mucoso, olor a oxigenta	Negativo
Re04Pb2(1)A	Negativo	Estreptobacilos, y bacilos aislados	Colonias amarillentas de forma redonda pequeñas de 1 a 2 mm de diámetro, olor a oxigenta	Positivo

Continuación de la Tabla 7.

M5Pb2(2)A	Negativo	Bacilos, estreptobacilos y agrupaciones en “V”	Colonias blanquecinas redondas de 2 a 4 mm de diámetro de aspecto mucoide, olor a putrefacción	Positivo
LPS01Cr1	Negativo	Bacilos rectos, curvados y estreptobacilos	Colonias blanquecinas, redondas pequeñas de 3 a 5 mm de diámetro, aglomeradas, olor a oxigenta	Positivo
LPS01Pb1(2)A	Negativo	Bacilos aislados algo curvados y agrupaciones en “V”	Colonia blanquecina, aglomerada de aspecto mucoide, olor a humedad	Positivo

Nota: Ver fotografías tomadas al microscopio de cada cepa en la Tabla 9.

Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

En la Tabla 7 se muestra los resultados de la tinción Gram de las 5 cepas bacterianas caracterizadas en los experimentos, también se ha realizado una descripción microscópica analizando principalmente su morfología, en la descripción macroscópica se detalla aspectos como: color, olor y tamaño de las colonias y finalmente se indica los resultados obtenidos en las pruebas de oxidasa.

#### 4.5. Caracterización bioquímica de bacterias

Tabla 8.

Pruebas bioquímicas Kit Microgen ID A+B

Código		CdM201	Re04Pb2(1)A	M5Pb2(2)A	LPS01Cr1	LPS01Pb1(2)A
Reacción	Oxidasa	-	+	+	+	+
	No. Motilidad	-	-	-	-	-
	pocillo Nitrato	-	+	+	+	+

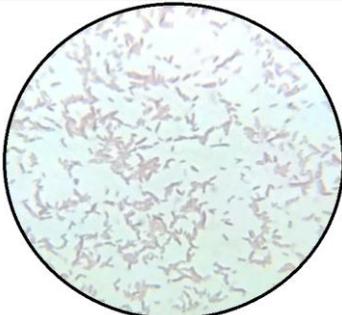
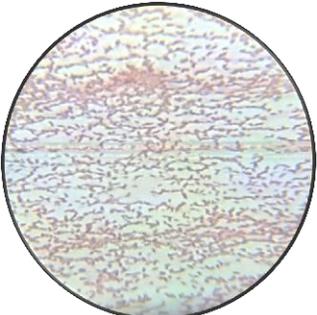
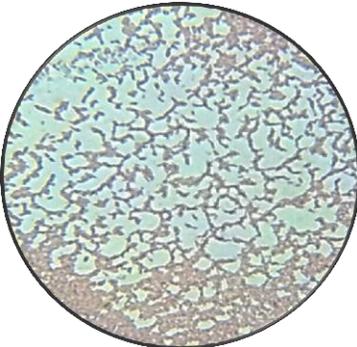
Continuación de la Tabla 8.

<b>GN A wells</b>	1	Lisina	+	+	-	+	-
	2	Ornitina	-	-	+	-	-
	3	H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
	4	Glucosa	-	+	+	-	+
	5	Manitol	-	-	+	-	+
	6	Xilosa	+	-	+	+	-
	7	ONPG	-	-	+	+	-
	8	Indol	-	-	+	-	-
	9	Ureasa	-	-	-	-	-
	10	V.P.	-	-	-	-	+
	11	Citrato	-	-	+	-	-
	12	TDA	-	-	-	-	-
<b>GN B wells</b>	13	Gelatina	-	-	+	-	-
	14	Malonato	-	-	+	-	-
	15	Inositol	-	-	-	-	-
	16	Sorbitol	-	-	+	-	-
	17	Ramnosa	-	-	+	-	+
	18	Sacarosa	-	-	+	-	+
	19	Lactosa	-	-	-	-	-
	20	Arabinosa	-	-	+	-	+
	21	Adonitol	-	-	+	-	-
	22	Rafinosa	-	-	+	-	-
	23	Salicina	+	-	+	-	-
	24	Arginina	+	+	+	+	+

Nota: S. Guerra y G. Reinoso

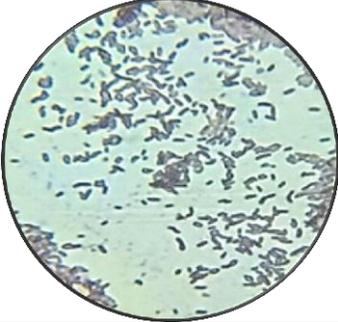
En la Tabla 8 se indica los resultados del perfil bioquímico de las 5 cepas bacterianas analizadas en los experimentos, para lo cual se llevó a cabo la metodología descrita en el manual del usuario del Sistema Microgen GN-ID A+B. Para la identificación de las bacterias se utilizó el Software Microgen Identification (MID-60).

Tabla 9.  
Identificación de las cepas bacterianas

Cepas	Identificación	Porcentaje de certeza	Fotografía microscópica	Aplicación en Biorremediación
CdM201	<i>Acinetobacter sp</i>	50,70%		Degradan hidrocarburos y fracciones de alcanos
Re04Pb2(1)A	<i>Photobacterium damsela</i>	99,80%		No se encontraron aplicaciones en biorremediación
LPS01Cr1	<i>Pseudomona sp</i>	64,50%		Degradan n-hexadecano, hidrocarburos aromáticos y pireno y mineraliza compuestos alifáticos
M5Pb2(2)A	<i>Aeromona hydrophila</i>	93,80%		Sensibilidad al cromato, resistente al mercurio y plomo

Continuación Tabla 9.

---

LPS01Pb1(2)A	<i>Aeromona sp</i>	64,50%		No se encontraron aplicaciones en biorremediación
--------------	--------------------	--------	--	---

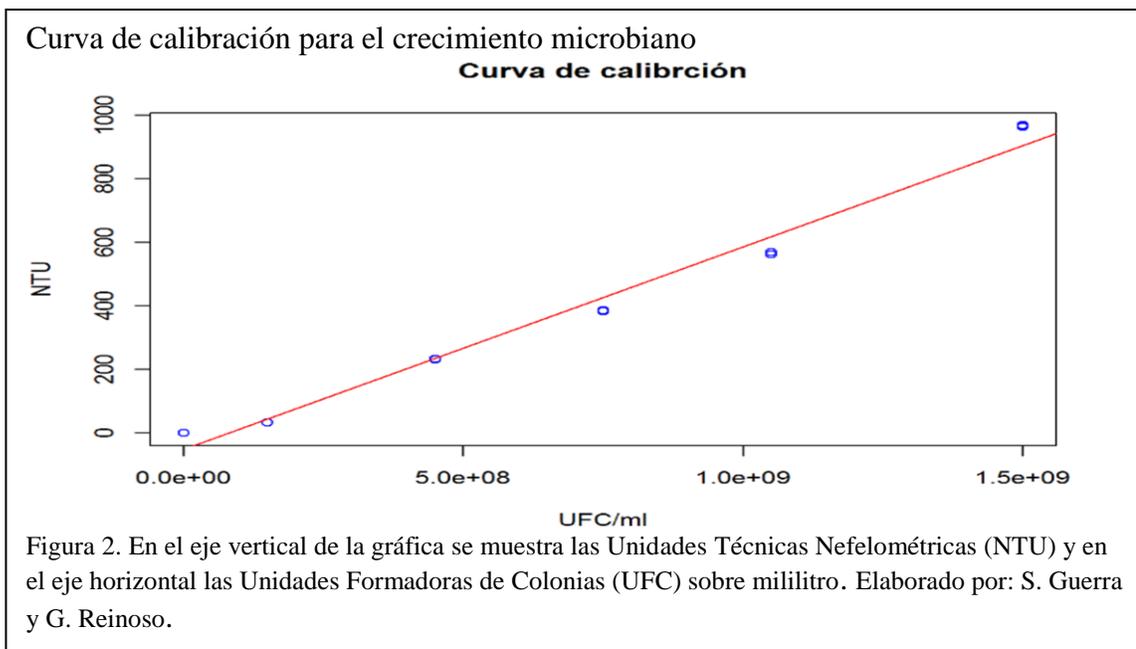
---

Nota: Las aplicaciones en biorremediación han sido obtenidas de la investigación: Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo (Soto et al., 2010) y Potential of *Pseudomonas sp. JH 51-2* to stabilize lead in mining site soil (Jaehong, Patrick, Ik-Boo, Byung, & Min, 2015).

Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

En la Tabla 9 se muestra la identificación de las bacterias tras los análisis de las pruebas bioquímicas (Ver Anexo 3), si el resultado en el porcentaje de certeza es 95% o superior quiere decir que existe una buena aproximación a la especie, caso contrario, si el resultado es inferior al 95% quiere decir que existe una aproximación al género. Los resultados indicaron que únicamente *Photobacterium damsela* tiene el 99.8% de certeza, es decir, existe gran aproximación a la especie, mientras que las otras cuatro cepas analizadas mostraron porcentajes inferiores al 95%, mostrando una buena aproximación al género.

#### 4.6. Curvas de calibración



Al realizar la curva de calibración de crecimiento microbiano de la Figura 2, se obtuvo la ecuación (9), que describe la concentración de las bacterias en UFC/ml respecto al tiempo.

$$Y = 6.37 \times 10^{-7} X - 5.055 \quad (9)$$

Dónde: Y simboliza la turbidez medida con el equipo y X representa la concentración de las bacterias en UFC/ml. El valor de  $R^2$  calculado fue de 0,9822. La Figura de la curva de análisis de residuos vs valores ajustados se muestran en el Anexo 4.

La Figura 3 muestra los valores de los estándares de la escala McFarland, sus concentraciones y el valor de absorbancia promedio.

Curva de calibración de la absorción atómica en función de la concentración de Pb.

**A**

Curva de Calibración de Plomo

Standard	Concentración	Valor (absorbancia)
0	0,00	0,000
1	5,00	0,060
2	15,00	0,156
3	30,00	0,286

**B**

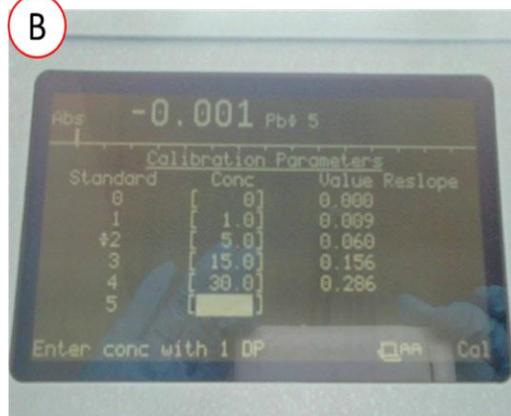


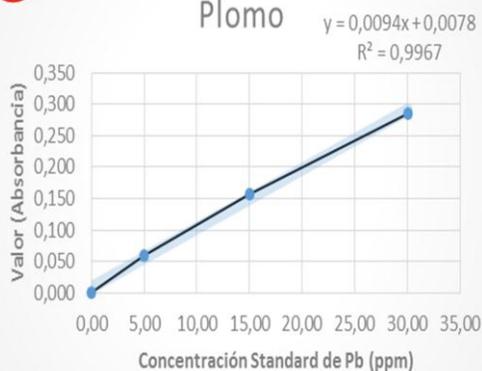
Figura 3. El literal A muestra los valores de tabla realizada en Excel, mientras que el literal B los resultados obtenidos en el equipo. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

### Curva de calibración y ecuación de regresión lineal.

Curva de calibración de absorción atómica en función de la concentración de Pb

**A**

Curva de Calibración de Plomo



**B**

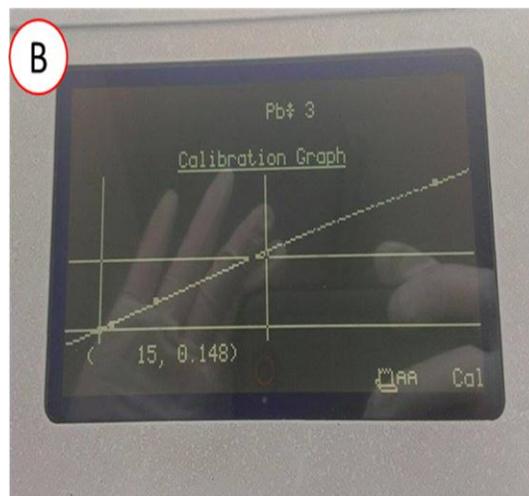


Figura 4. El literal A muestra la gráfica obtenida en Excel, mientras que B la gráfica obtenida en el equipo.

Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

Al realizar la curva de calibración de Pb como se muestra en la Figura 4 se obtuvo la ecuación (10), que relaciona el valor de la absorbancia con la concentración del metal.

$$Y = 0.0094 X + 0.0078 \quad (10)$$

Dónde: Y simboliza la absorbancia obtenida en la muestra de cultivo y X representa la concentración del estándar de plomo. El valor de  $R^2$  calculado fue 0,99999.

#### **4.7. Análisis de la cinética de crecimiento bacteriano y remoción de Pb**

Para la evaluación de la cinética de crecimiento bacteriano y la remoción de Pb se realizó un análisis de cada cepa a concentraciones de 20 y 100 ppm en incubación a temperatura ambiente e incubación a temperatura controlada de 25 °C.

##### **4.7.1. Cepa 1. *Acinetobacter sp* (CdM201)**

###### *Coefficiente de correlación de Pearson - Acinetobacter sp*

En la Tabla 10 se muestra el coeficiente de correlación entre el Log [ ] (linealización de la curva del crecimiento bacteriano, aplicando el logaritmo en base 10 de la concentración de UFC) y: tiempo, temperatura interna del cultivo (TEMP), pH y la concentración de Pb. Los resultados indican que el crecimiento bacteriano está directamente relacionado con el tiempo, tanto en incubación a 25 °C como a temperatura ambiente para las concentraciones de 20 y 100 ppm; por otra parte la temperatura interna del cultivo es independiente del crecimiento bacteriano para las dos concentraciones y temperaturas ensayadas; para el caso del pH no existe relación a 20 ppm a ninguna temperatura de incubación, sin embargo, a 100 ppm se muestra una relación directa con el crecimiento bacteriano. Finalmente la concentración de Pb en la muestra está

influenciado de manera inversa por el crecimiento bacteriano, es decir, que mientras mayor sea el número de UFCs, menor será la concentración de Pb.

Tabla 10.

Correlación de Pearson - *Acinetobacter sp*

Correlaciones de Pearson								
Log [ ]								
Concentración	Tiempo		TEMP		pH		[Pb] remanente	
	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente
<b>20 ppm</b>	0,93572	0,94589	0,48496	0,12815	-0,33838	0,44135	-0,96096	-0,93759
<b>100 ppm</b>	0,95731	0,92142	0,39799	0,12050	0,85920	0,80741	-0,92432	-0,66785

Nota: TEMP. Temperatura interna del cultivo. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

### Crecimiento bacteriano - *Acinetobacter sp*

En la Tabla 11 se puede visualizar que *Acinetobacter sp* crece con mayor facilidad a una concentración de 20 ppm en los 2 bloques analizados; incubación a temperatura ambiente e incubación a temperatura controlada (25 °C), debido a que, a 20 ppm se tiene mayor velocidad de crecimiento y mayor número de generaciones en un tiempo de generación menor.

Tabla 11.

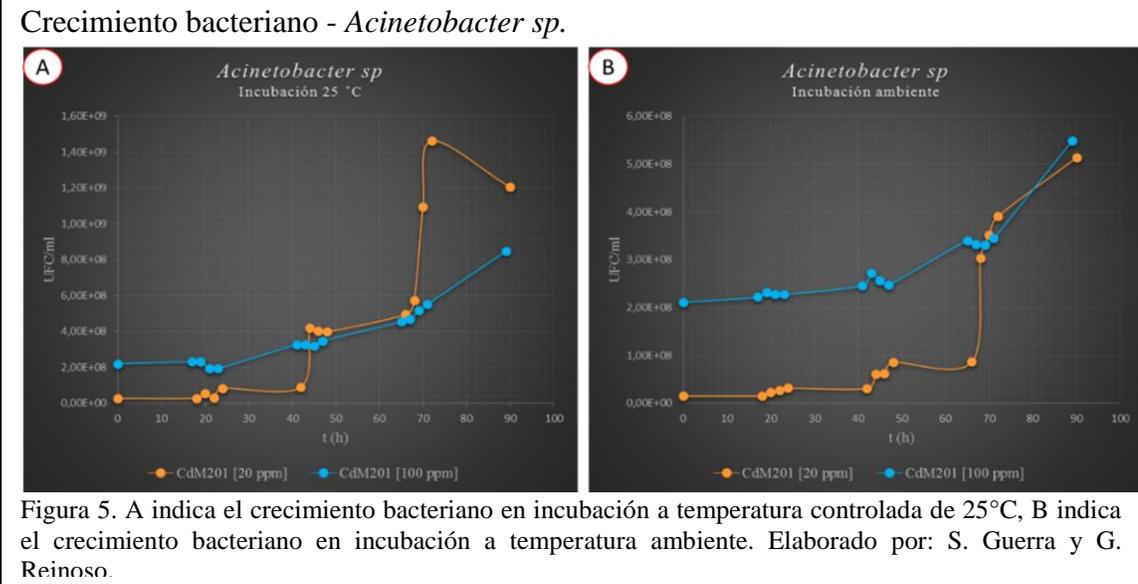
Crecimiento bacteriano - *Acinetobacter sp*

<i>Acinetobacter sp</i>						
Parámetro calculado	Símbología	Incubación 25 °C		Incubación ambiente		Unidades
		Concentración				
		20 ppm	100 ppm	20 ppm	100 ppm	
Area bajo la curva	A	1,41E+10	2,74E+10	4,50E+09	2,10E+10	u <sup>2</sup>
Velocidad de crecimiento	K	6,06E-02	2,19E-02	5,64E-02	1,55E-02	gen/hora
Tiempo de generación	g	1,65E+01	4,57E+01	1,77E+01	6,46E+01	horas
Número de generaciones	n	5,46	1,95	5,08	1,38	generaciones

Nota: S. Guerra y G. Reinoso.

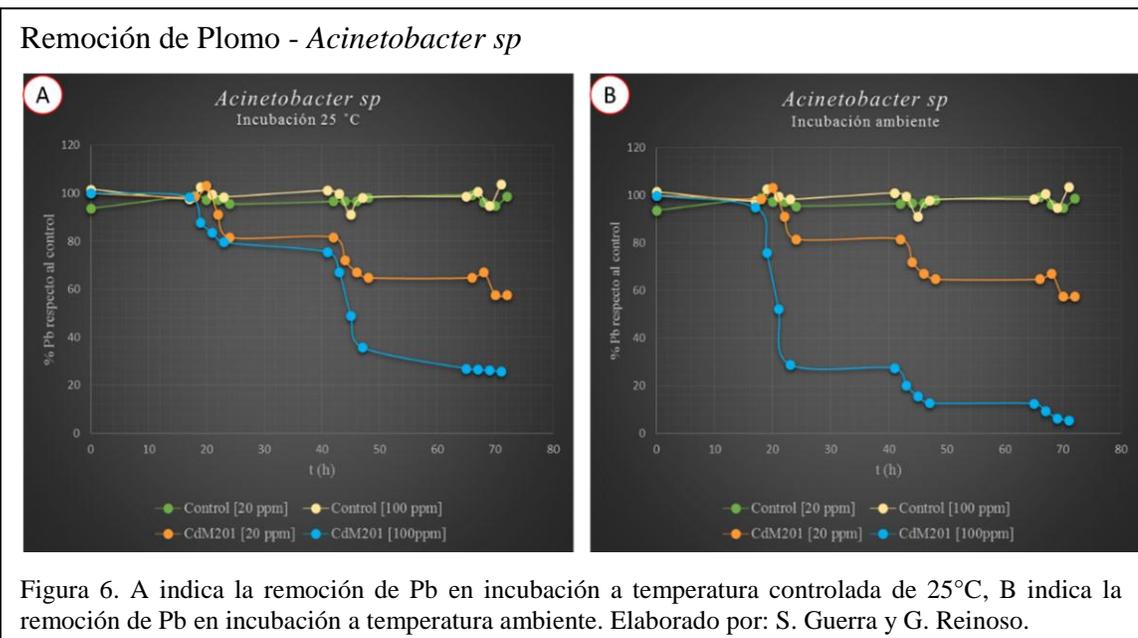
La Figura 5 indica que *Acinetobacter sp* a 20 ppm y a temperatura de incubación ambiente tiene un crecimiento exponencial entre la hora 66 y la hora 72. Mientras que a

temperatura de incubación controlada a 25 °C existe un ligero crecimiento entre la hora 70 y la hora 90.



### Remoción de Pb - *Acinetobacter sp.*

En la Figura 6 se representa las curvas del porcentaje de remoción de Pb en función del tiempo a 20 y 100 ppm y sus curvas de control respectivamente. De esto, se puede evidenciar que a concentraciones de 100 ppm se obtiene un mayor porcentaje de remoción para los dos bloques analizados.



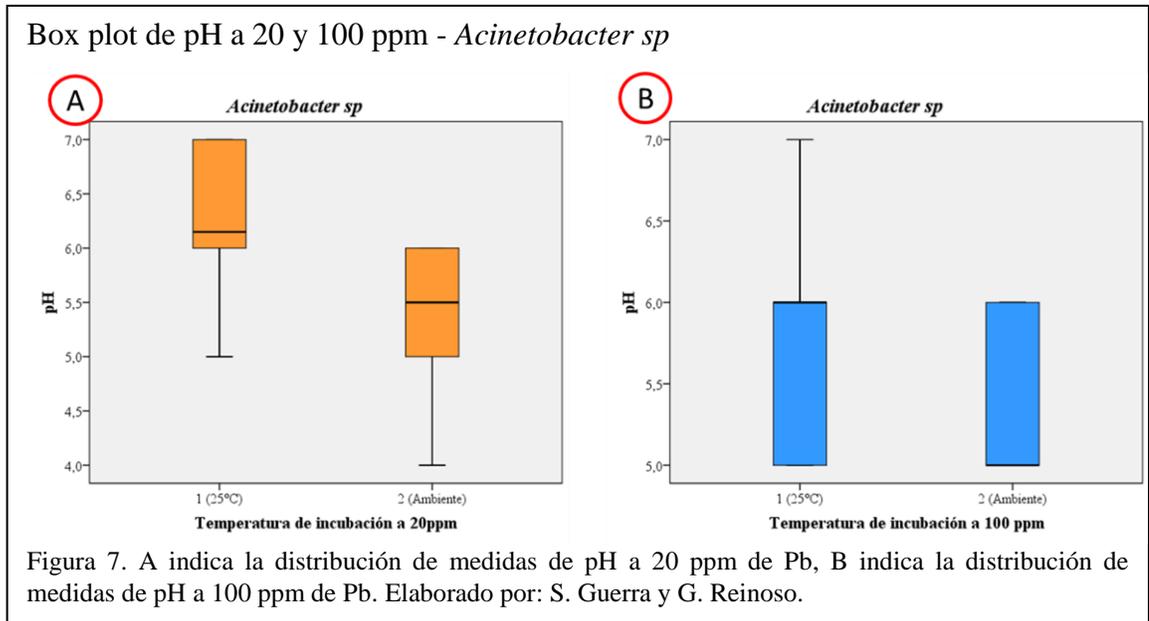
### *Interpretación estadística de datos - Acinetobacter sp*

En el Anexo 5 se indica los resultados de las pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para *Acinetobacter sp*, el análisis del nivel de significancia de esta prueba nos muestra un valor inferior al 0,05 para los datos del pH a 20 y 100 ppm, esto quiere decir que la prueba estadística a utilizar es la U de Mann Whitney que se emplea para el análisis de las medidas de tendencia central, y para los datos de la temperatura interna del cultivo la significancia resultó mayor al 0,05 por esta razón se utilizó la prueba t\_Student para 20 y 100 ppm.

### *Análisis estadístico de pH a 20 y 100 ppm - Acinetobacter sp*

La Figura 7 muestra que a 20 ppm el comportamiento de los datos es diferente entre ambos bloques experimentados, para el bloque 1 (incubación a temperatura controlada de 25°C), el valor de la mediana calculado fue 6,2 el rango de pH varió entre un valor máximo de 7 y un valor mínimo de 5; en el bloque 2 (incubación a temperatura ambiente) el valor de la mediana fue aproximadamente 5,5 y su rango de pH varió de 4 a 7. A 100 ppm los datos se comportaron de manera similar su rango varió entre un valor mínimo de 5 y un máximo de 6 en los dos bloques, el valor de la mediana en el bloque 1 fue 6 y 5 en el bloque 2.

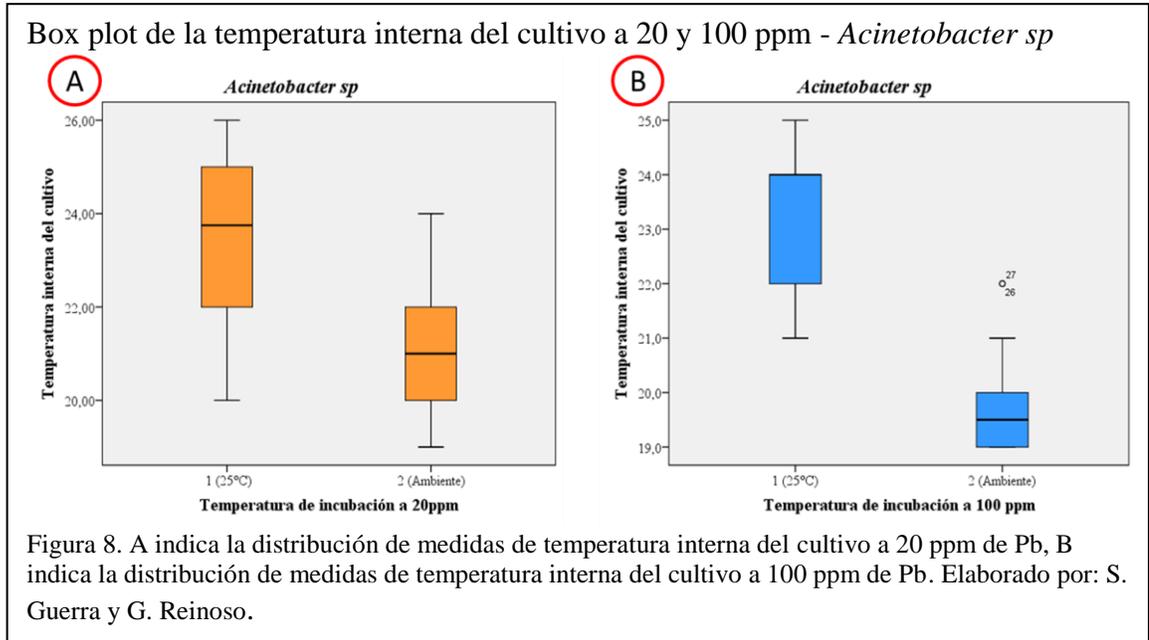
Adicionalmente se realizó la prueba estadística U de Mann Whitney donde el valor de significancia bilateral asintótica para 20 ppm fue de 0,001 es decir, que las medias de los valores de pH son diferentes entre el bloque 1 y el bloque 2. A 100 ppm el valor de significancia asintótica bilateral fue de 0,112 lo que significa que las medias de los valores de pH entre los 2 bloques analizados son iguales entre sí. (Anexo 6.)



*Análisis estadístico de la temperatura interna del cultivo a 20 y 100 ppm - Acinetobacter sp*

La Figura 8 muestra que los datos a 20 y 100 ppm tienen un comportamiento diferente, a 20 ppm el valor de la mediana calculada para el bloque 1 fue aproximadamente 23,8 °C, el rango varió entre un valor máximo de 26°C y un valor mínimo de 20°C; en el bloque 2 el valor de la mediana fue aproximadamente 21°C y su rango va de 19 a 24°C. A 100 ppm el valor de la mediana para el bloque 1 fue aproximadamente 24°C el rango varió entre un valor máximo de 25°C y un valor mínimo de 21°C; en el bloque 2 el valor de la mediana fue aproximadamente 19,5 °C y su rango se encuentra comprendido entre los 19 y 21°C.

El estadístico t calculado para la temperatura interna del cultivo (Ver Anexo 7), muestra una significancia bilateral asintótica de 0,001 a 20 ppm y 0,000 a 100 ppm, lo que nos indica que las medias entre los dos bloques son diferentes entre sí.



#### 4.7.2. Cepa 2. *Photobacterium damsela* (Re04Pb2 (1) A)

##### *Coeficiente de correlación de Pearson - Photobacterium damsela*

En la Tabla 12 los resultados indican que el crecimiento bacteriano está directamente relacionado con el tiempo, tanto en incubación a 25 °C como a temperatura ambiente para las concentraciones de 20 y 100 ppm; por otra parte se determinó que la temperatura interna del cultivo y el pH son independientes del crecimiento bacteriano; mientras que el Pb remanente en la muestra se ve influenciada de manera inversa por el crecimiento bacteriano, es decir, que mientras el número de UFC aumenta, la concentración de Pb disminuye.

Tabla 12.

##### Correlación de Pearson - *Photobacterium damsela*

Correlaciones de Pearson								
Log [ ]								
Concentración	Tiempo		TEMP		pH		Plomo	
	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente
20 ppm	0,91341	0,90300	0,49859	-0,02924	0,38671	0,45056	-0,95832	-0,87252
100 ppm	0,96454	0,84712	0,40033	0,07862	0,85456	0,48701	-0,77666	-0,83597

Nota: TEMP. Temperatura interna del cultivo. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

### Crecimiento bacteriano - *Photobacterium damsela*

La Tabla 13 refleja que a incubación controlada (25°C), *Photobacterium damsela* presenta aproximadamente la misma facilidad de crecimiento bacteriano para 20 y 100 ppm. Por otro lado, existe un mayor crecimiento bacteriano en incubación a temperatura ambiente a 100 ppm, ya que los valores de velocidad de crecimiento y número de generaciones son más altos en relación a 20 ppm a un tiempo de generación más bajo.

Tabla 13.

### Crecimiento bacteriano - *Photobacterium damsela*

<i>Photobacterium damsela</i>						
Parámetro calculado	Símbología	Incubación 25 °C		Incubación ambiente		Unidades
		Concentración				
		20 ppm	100 ppm	20 ppm	100 ppm	
Area bajo la curva	A	7,97E+09	2,53E+10	2,28E+09	1,48E+10	u <sup>2</sup>
Velocidad de crecimiento	K	4,86E-02	4,78E-02	4,06E-02	4,71E-02	gen/hora
Tiempo de generación	g	2,06E+01	2,09E+01	2,46E+01	2,13E+01	horas
Número de generaciones	n	4,37	4,25	3,66	4,19	generaciones

Nota: S. Guerra y G. Reinoso.

La Figura 9 indica que *Photobacterium damsela* a 20 ppm y a temperatura de incubación controlada (25°C) tuvo un crecimiento exponencial entre las 60 y 70 horas y, a partir de este punto, presenta un descenso en el número de UFC. Por otro lado. Para el caso de incubación a temperatura ambiente es evidente que existe un mejor crecimiento de *Photobacterium damsela* a 100 ppm.

Crecimiento bacteriano - *Photobacterium damsela* (Re04Pb2 (1) A).

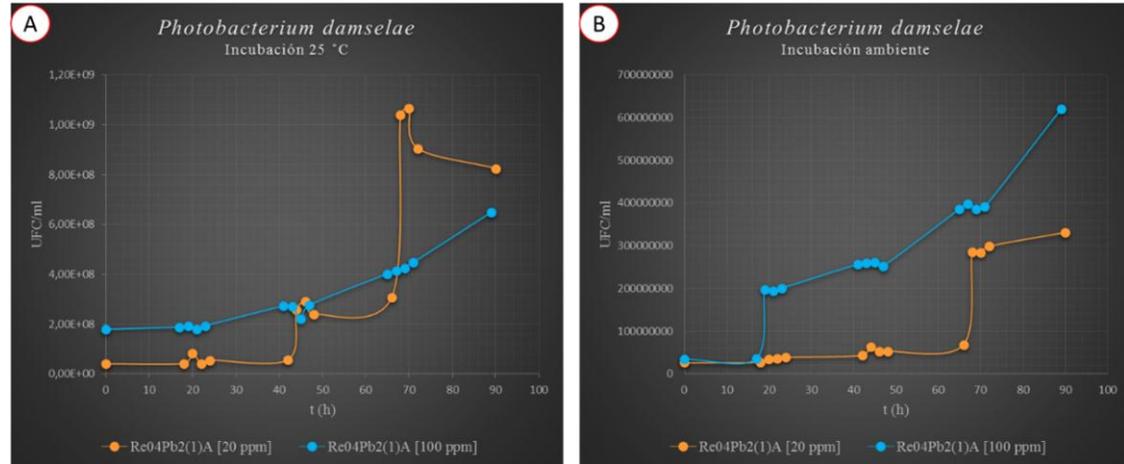


Figura 9. A indica el crecimiento bacteriano en incubación a temperatura controlada de 25°C, B indica el crecimiento bacteriano en incubación a temperatura ambiente. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

Remoción de Pb - *Photobacterium damsela*

La Figura 10 muestra el porcentaje de remoción de Pb a 20 y 100 ppm con relación al porcentaje de control de Pb respectivo, en donde se determinó que *Photobacterium damsela* presentó mayor porcentaje de remoción de Pb a una concentración de 100 ppm para las dos temperaturas de incubación analizadas.

Remoción de Pb - *Photobacterium damsela*

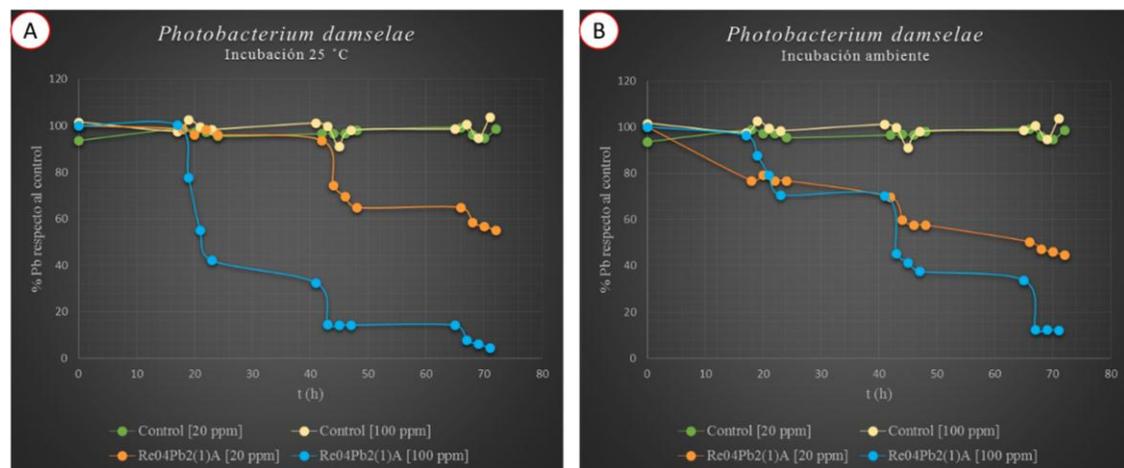


Figura 10. A indica la remoción de Pb en incubación a temperatura controlada de 25°C, B indica la remoción de Pb en incubación a temperatura ambiente. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

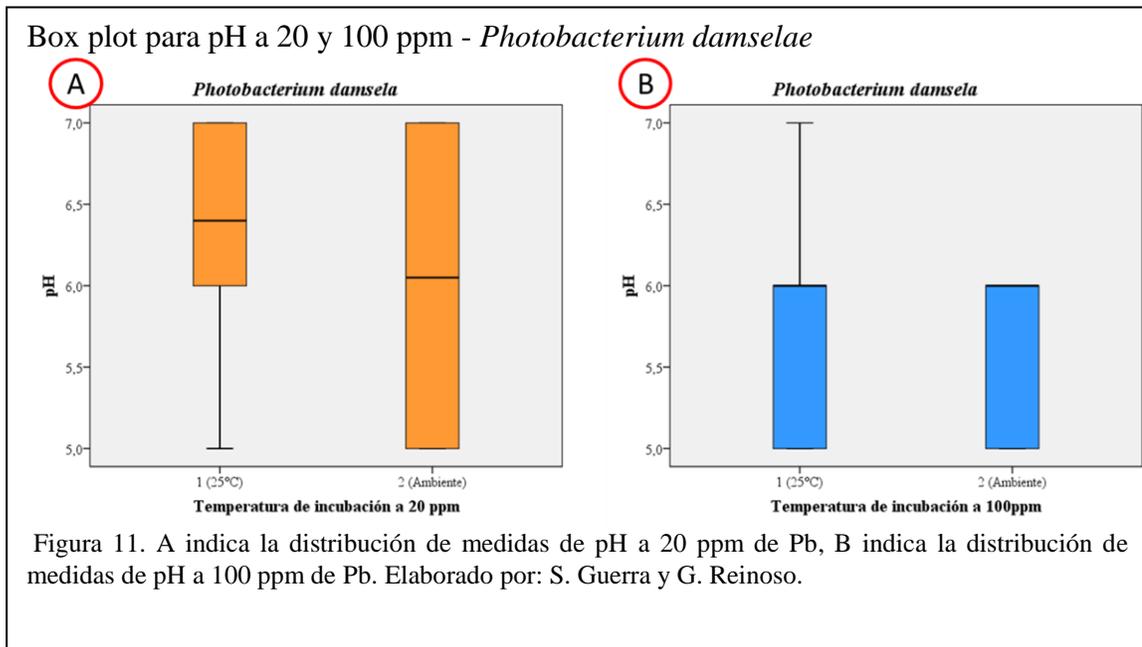
### *Interpretación estadística de datos - Photobacterium damsela*

En el Anexo 8 se indica los resultados de las pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para los datos del pH y temperatura interna del cultivo a 20 y 100 ppm, en donde se determinó que la prueba estadística U de Mann Whitney fue utilizada para el análisis las medidas de tendencia central, tanto para pH a 20 y 100 ppm como para la temperatura interna del cultivo a 20 ppm, debido a que presentaron un nivel de significancia inferior al 0,05. Mientras que para la temperatura interna del cultivo a 100 ppm se evidenció un nivel de significancia mayor al 0,05, por esta razón se utilizó la prueba t\_Student.

### *Análisis estadístico de pH a 20 y 100 ppm - Photobacterium damsela*

La Figura 11 muestra que los valores de pH a 20 ppm presentaron un comportamiento similar, en donde, el valor de la mediana para el bloque 1 es 6,4, el rango de pH varió entre 5 y 7; en el bloque 2 la mediana tuvo un valor de 6,05 y su rango de pH varió de 5 a 7. A 100 ppm los datos se comportaron de manera similar, el valor de la mediana para ambos bloques fue de 6, sus rangos variaron entre 5 y 7 para el bloque 1 y de 5 a 6 para el bloque 2.

Se llevó a cabo la prueba estadística U de Mann Whitney para las dos concentraciones estudiadas, donde el valor de significancia bilateral asintótica para 20 y 100 ppm fue de 0,477 y 0,834 respectivamente lo que significa, que las medias de los valores de pH son iguales entre la incubación a temperatura controlada (25 °C) y la incubación a temperatura ambiente. (Ver Anexo 9)

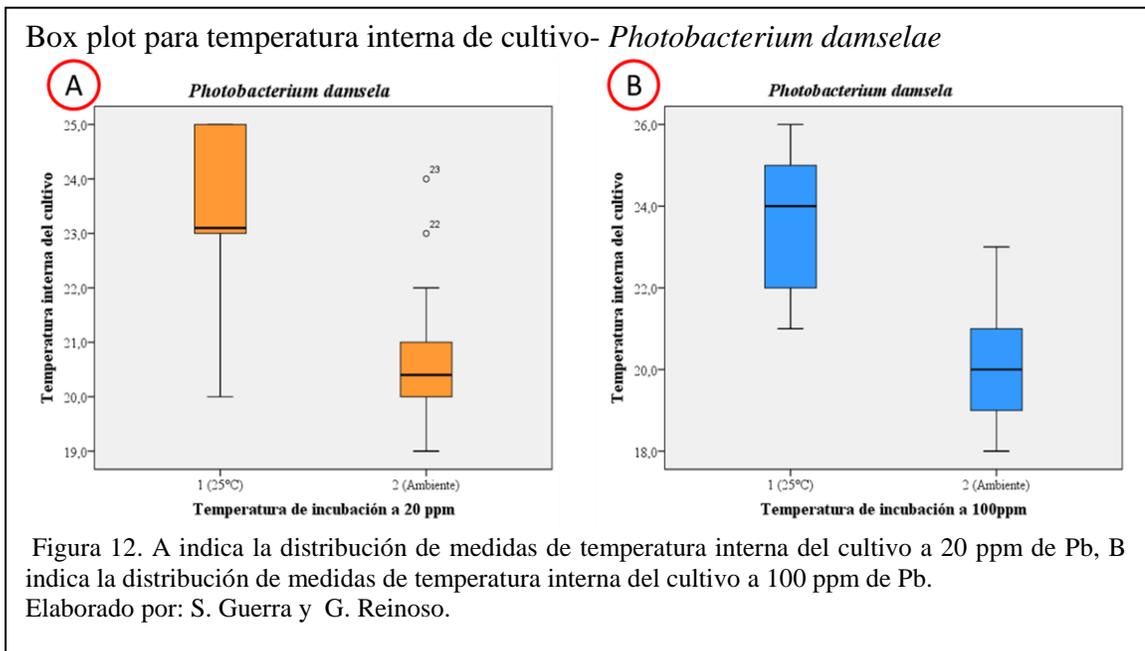


*Análisis estadístico de la temperatura interna de cultivo a 20 y 100 ppm - Photobacterium damsela*

La Figura 12 revela que para ambas concentraciones de 20 y 100 ppm los datos mantienen un comportamiento diferente entre sí. A 20 ppm para el bloque 1 la mediana fue 23,1 con un rango de temperatura interna que fluctuó entre 20 y 25; mientras que para el bloque 2 la mediana tuvo un valor de 20,4 y un rango de 19 a 22°C, con valores atípicos de temperatura a 23 y 24°C. A 100 ppm el bloque 1 presentó una mediana de 24 °C con un rango entre 21 y 26°C, mientras que para el bloque 2 el valor de la mediana fue de 20°C con rango que va desde 18 a 23°C.

La temperatura interna de cultivo para la concentración de 20 ppm fue analizada mediante la prueba estadística U de Mann Whitney, donde el valor de significancia bilateral asintótica fue de 0,001 lo que significa que las medias de los valores de temperatura fueron diferentes en incubación a temperatura controlada (25 °C) como a

temperatura ambiente. (Ver Anexo 9). Por otro lado, la temperatura interna de cultivo a 100 ppm fue analizada por la prueba t de Student (Ver Anexo 10), en donde se reflejó una significancia de 0,000 lo que significa que, de la misma manera, las medias de los valores de temperatura son diferentes entre los dos bloques de incubación.



### 4.7.3. Cepa 3. *Pseudomona sp (LPS01Cr1)*

#### *Coefficiente de correlación de Pearson - Pseudomona sp*

Los resultados de la Tabla 14 reflejan que el crecimiento bacteriano en presencia de Pb a 20 y 100 ppm está relacionado directamente con el tiempo para los dos bloques de incubación; por otra parte se determinó que la temperatura interna del cultivo y el pH son independientes del crecimiento bacteriano; mientras que el Pb remanente en la muestra se relaciona de manera inversa por el crecimiento bacteriano, es decir, que a mayor número de UFCs, menor será la concentración de Pb remanente.

Tabla 14.

Correlación de Pearson - *Pseudomona sp*

Correlaciones de Pearson								
Log [ ]								
Concentración	Tiempo		TEMP		pH		Plomo	
	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente
<b>20 ppm</b>	0,90216	0,97364	-0,03683	-0,35476	0,49902	-0,00700	-0,89637	-0,96577
<b>100 ppm</b>	0,97732	0,96210	0,06623	0,12571	-0,42956	-0,30731	-0,97293	-0,85167

Nota: TEMP. Temperatura medida. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

*Crecimiento bacteriano - Pseudomona sp*

Los datos de la Tabla 15 manifiestan que *Pseudomona sp* crece con mayor facilidad a 20 ppm tanto en incubación controlada a 25°C como incubación a temperatura ambiente, ya que se evidencian valores de velocidad de crecimiento y número de generaciones mayores que los valores a 100 ppm y por el contrario, tiempos de generación menor.

Tabla 15.

Crecimiento bacteriano - *Pseudomona sp*

<i>Pseudomona sp</i>						
Parámetro calculado	Símbología	Incubación 25 °C		Incubación ambiente		Unidades
		Concentración				
		20 ppm	100 ppm	20 ppm	100 ppm	
Area bajo la curva	A	2,07E+10	3,18E+10	7,03E+09	3,01E+10	u <sup>2</sup>
Velocidad de crecimiento	K	4,89E-02	3,21E-02	6,84E-02	3,29E-02	gen/hora
Tiempo de generación	g	2,04E+01	3,12E+01	1,46E+01	3,04E+01	horas
Número de generaciones	n	3,47	2,28	4,86	2,33	generaciones

Nota: S. Guerra y G. Reinoso.

La Figura 13 indica que *Pseudomona sp* se desarrolla de mejor manera en incubación controlada a 25°C tanto a 20 como a 100 ppm en relación a la incubación realizada a temperatura ambiente, sin embargo, a ésta temperatura de incubación a 100 ppm se refleja un crecimiento exponencial a partir de las 20 horas aproximadamente.

### Crecimiento bacteriano - *Pseudomona sp*

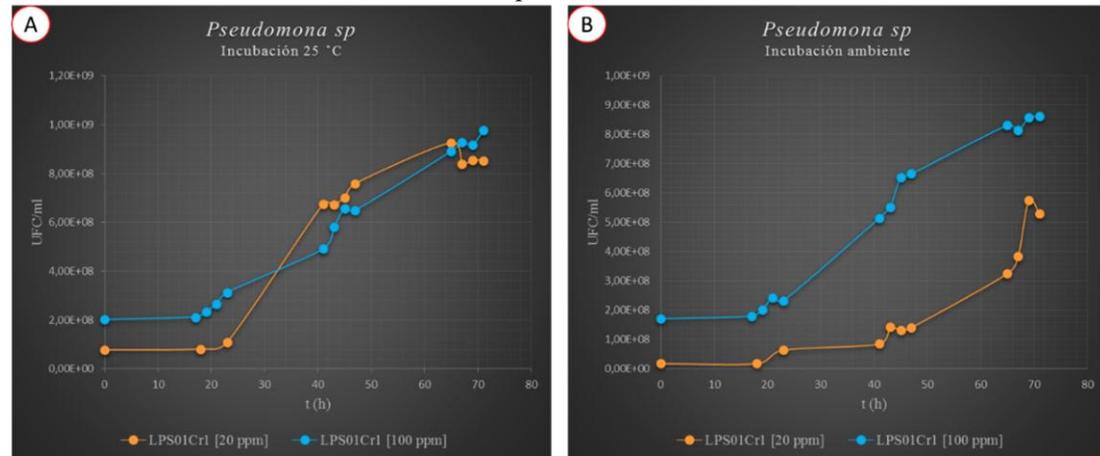


Figura 13. A indica el crecimiento bacteriano en incubación a temperatura controlada de 25°C, B indica el crecimiento bacteriano en incubación a temperatura ambiente. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

### Remoción de Pb - *Pseudomona sp*

La Figura 14 muestra el porcentaje de remoción de Pb a 20 y 100 ppm con relación al porcentaje de control de Pb respectivo, donde se determinó que *Pseudomona sp* a 20 ppm remueve aproximadamente el mismo porcentaje del metal en los dos bloques de temperatura estudiados, sin embargo es notorio que existe un mayor porcentaje de remoción a una concentración de 100 ppm en incubación a temperatura ambiente.

### Remoción de Pb - *Pseudomona sp*

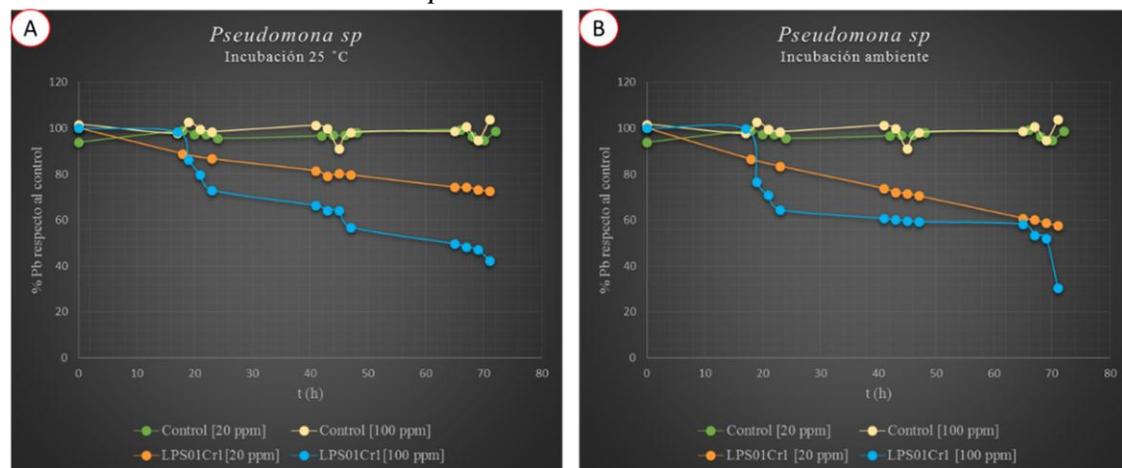


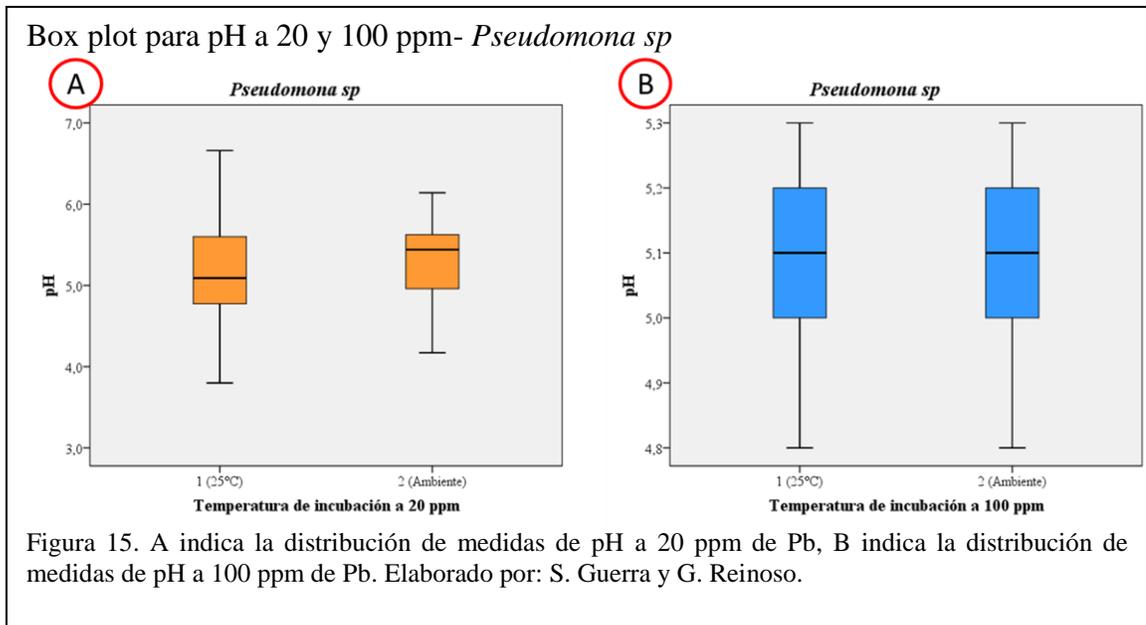
Figura 14. A indica la remoción de Pb en incubación a temperatura controlada de 25°C, B indica la remoción de Pb en incubación a temperatura ambiente. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

### *Interpretación estadística de datos - Pseudomona sp*

En el Anexo 11 se indica los resultados de las pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para los datos del pH y temperatura interna del cultivo a 20 y 100 ppm, donde se determina que la prueba estadística U de Mann Whitney fue utilizada para el análisis de las medidas de tendencia central en todos los casos.

### *Análisis estadístico de pH a 20 y 100 ppm - Pseudomona sp*

La Figura 15 muestra que los valores de pH a 20 ppm se comportan de diferente manera entre los dos bloques de incubación analizados, en donde, el valor de la mediana para el bloque 1 fue 5,09, rango de pH entre 3,8 y 6,7; en el bloque 2 la mediana tuvo un valor de 5,44 y su rango de pH varió de 4,2 a 6,1. A 100 ppm los datos se comportan de la misma manera entre sí, el valor de la mediana para ambos bloques fue 5,1 con un rango que varió de 4,8 a 5,3. La prueba estadística U de Mann Whitney ha sido utilizada para las dos concentraciones estudiadas, donde el valor de significancia bilateral asintótica para 20 y 100 ppm fue de 0,000 para ambos casos, lo que significa, que las medias de los valores de pH son diferentes entre la incubación a temperatura controlada (25 °C) y la incubación a temperatura ambiente. (Ver Anexo 12).

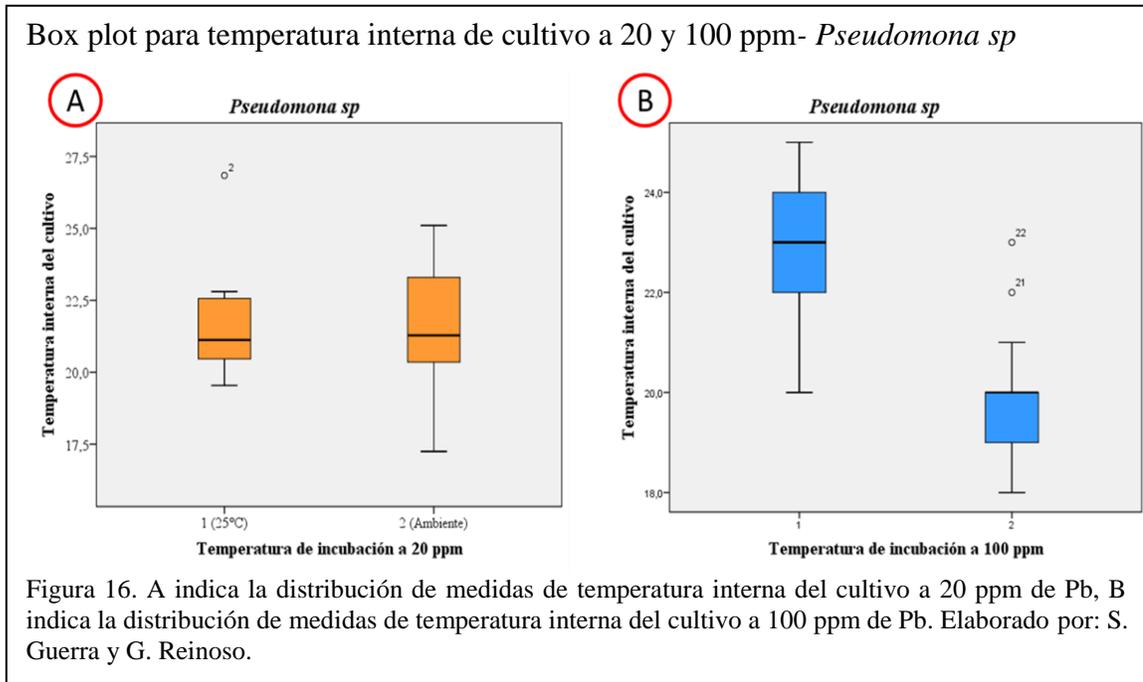


### *Análisis estadístico de la temperatura interna de cultivo a 20 y 100 ppm - Pseudomona sp*

La Figura 16 revela que para ambas concentraciones de 20 y 100 ppm los datos mantienen un comportamiento diferente entre sí. A 20 ppm para el bloque 1 la mediana fue de 21 °C con un rango de temperatura interna que fluctuó entre 19 y 26; mientras que para el bloque 2 la mediana tuvo un valor de 21°C y un rango de 17 a 25°C, con un valor atípico de temperatura de 26°C. A 100 ppm el bloque 1 presentó una mediana de 23°C con un rango entre 20 y 25°C, mientras que para el bloque 2 el valor de la mediana fue 20°C con rango que va desde 18 a 23°C, con valores atípicos de 25 y 23°C.

La temperatura interna de cultivo para las dos concentraciones fue analizada mediante la prueba estadística U de Mann Whitney, donde el valor de significancia bilateral asintótica fue de 0,049 para 20 ppm, lo que significa que las medias de los valores de temperatura son iguales en incubación a temperatura controlada (25 °C) como a

temperatura ambiente. Por otro lado, para 100 ppm se obtuvo una significancia asintótica bilateral de 0,005 por lo tanto, las medias de los valores de temperatura son diferentes en incubación a temperatura controlada (25 °C) como a temperatura ambiente. (Ver Anexo 12).



#### 4.7.4. Cepa 4. *Aeromona hydrophila* M5Pb2 (2) A

##### *Coefficiente de correlación de Pearson - Aeromona hydrophila*

En la Tabla 16 los resultados indican que el crecimiento bacteriano tiene una relación directa con el tiempo, tanto en incubación a 25 °C como a temperatura ambiente para las concentraciones de 20 y 100 ppm; las variables: temperatura interna del cultivo (TEMP) y pH, son independientes del crecimiento bacteriano; y la concentración de Pb en la muestra está influenciada inversamente por el crecimiento bacteriano a 100 ppm en los 2 bloques, mientras que, a 20 ppm se puede observar que el crecimiento bacteriano se

relaciona de manera inversa únicamente con la concentración de Pb a temperatura ambiente.

Tabla 16.

Correlación de Pearson - *Aeromonas hydrophila*

Correlaciones de Pearson M5Pb2(2)A								
Log [ ]								
Concentración	Tiempo		TEMP		pH		Plomo	
	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente
20 ppm	0,89715	0,96423	-0,11952	-0,41228	-0,17069	0,51792	-0,40110	-0,93154
100 ppm	0,97295	0,97857	-0,12903	0,03208	-0,35038	-0,26751	-0,90911	-0,98149

Nota: TEMP. Temperatura interna del cultivo. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

*Crecimiento bacteriano - Aeromonas hydrophila*

En la Tabla 17 se puede observar que *Aeromonas hydrophila* crece con mayor facilidad a una concentración de 20 ppm en los 2 bloques analizados, puesto que, a 20 ppm los valores de velocidad de crecimiento y número de generaciones son más altos en relación a la concentración de 100 ppm, adicionalmente se pudo evidenciar que el tiempo de generación es menor a 20 ppm.

Tabla 17.

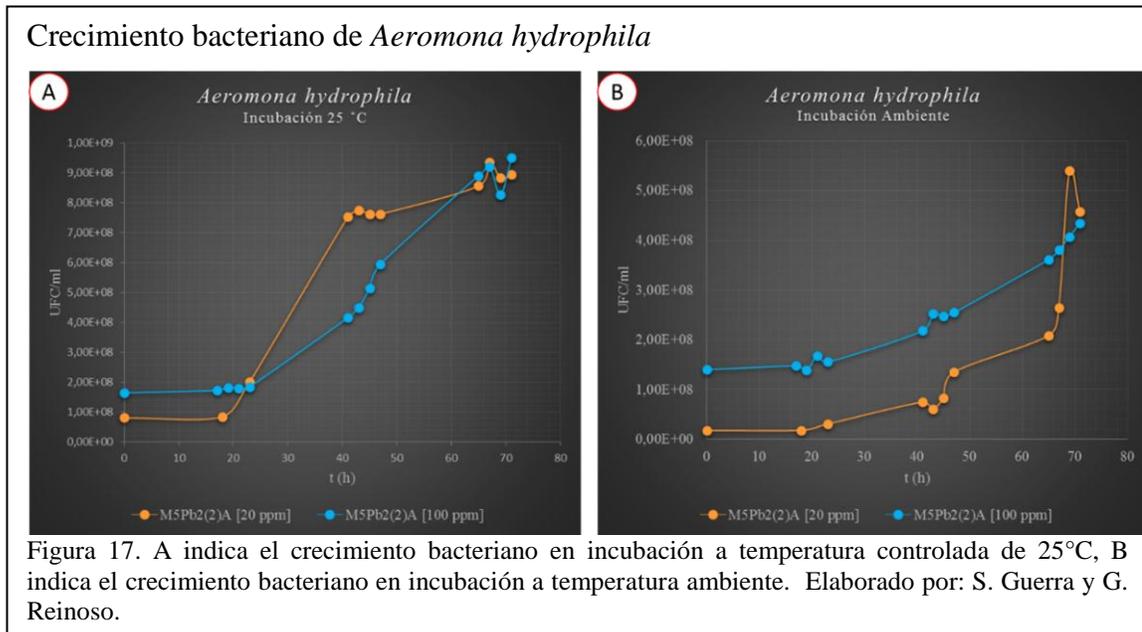
Crecimiento bacteriano de *Aeromonas hydrophila*

<i>Aeromonas hydrophila</i>						
Parámetro calculado	Símbología	Incubación 25 °C		Incubación ambiente		Unidades
		Concentración				
		20 ppm	100 ppm	20 ppm	100 ppm	
Area bajo la curva	A	1,89E+10	2,82E+10	4,78E+09	1,37E+10	u <sup>2</sup>
Velocidad de crecimiento	K	4,87E-02	3,57E-02	6,60E-02	2,29E-02	gen/hora
Tiempo de generación	g	2,05E+01	2,80E+01	1,52E+01	4,37E+01	horas
Número de generaciones	n	3,46	2,53	4,68	1,63	generaciones

Nota: S. Guerra y G. Reinoso.

La Figura 17 indica que *Aeromonas hydrophila* en concentraciones de 20 y 100 ppm el crecimiento bacteriano inició a partir de la hora 18, esto se pudo evidenciar en

incubación a 25°C e incubación a temperatura ambiente. El incremento en fase exponencial de UFCs ocurrió entre la hora 20 y 68 en incubación a temperatura controlada de 25°C, mientras que en incubación a temperatura ambiente a 20 ppm el crecimiento bacteriano tuvo un incremento acelerado entre las horas 66 y 70.



### Remoción de Pb - *Aeromonas hydrophila*

La Figura 18 muestra que en el bloque 2 a 100 ppm existe una disminución del 96% en la concentración de Pb y a 20 ppm la remoción de Pb fue del 52%, estos valores fueron obtenidos con respecto al control. En el bloque 1 la remoción de Pb a 100 ppm fue del 44,5% y a 20 ppm no se registró una remoción significativa durante el 97.1 % del tiempo del experimento.

## Remoción de Plomo - *Aeromonas hydrophila*

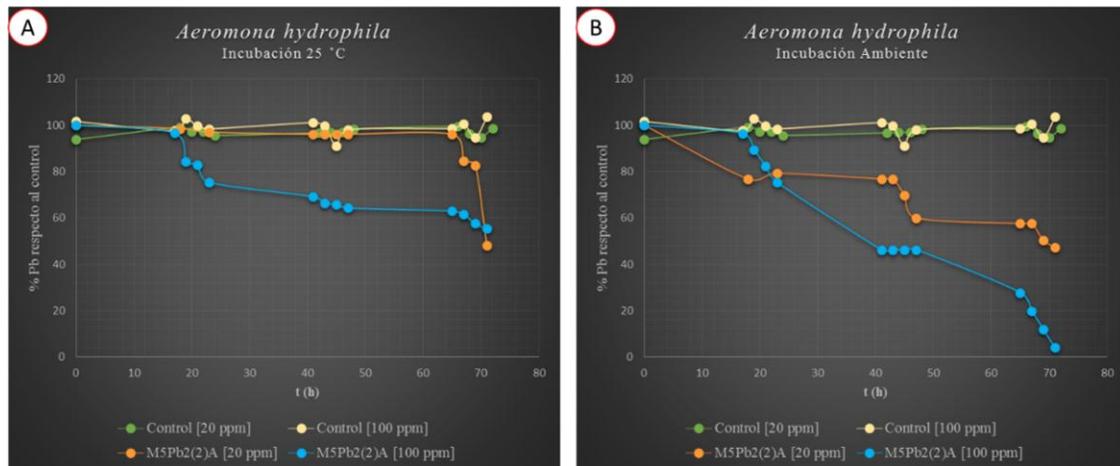


Figura 18. A indica la remoción de Pb en incubación a temperatura controlada de 25°C, B indica la remoción de Pb en incubación a temperatura ambiente. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

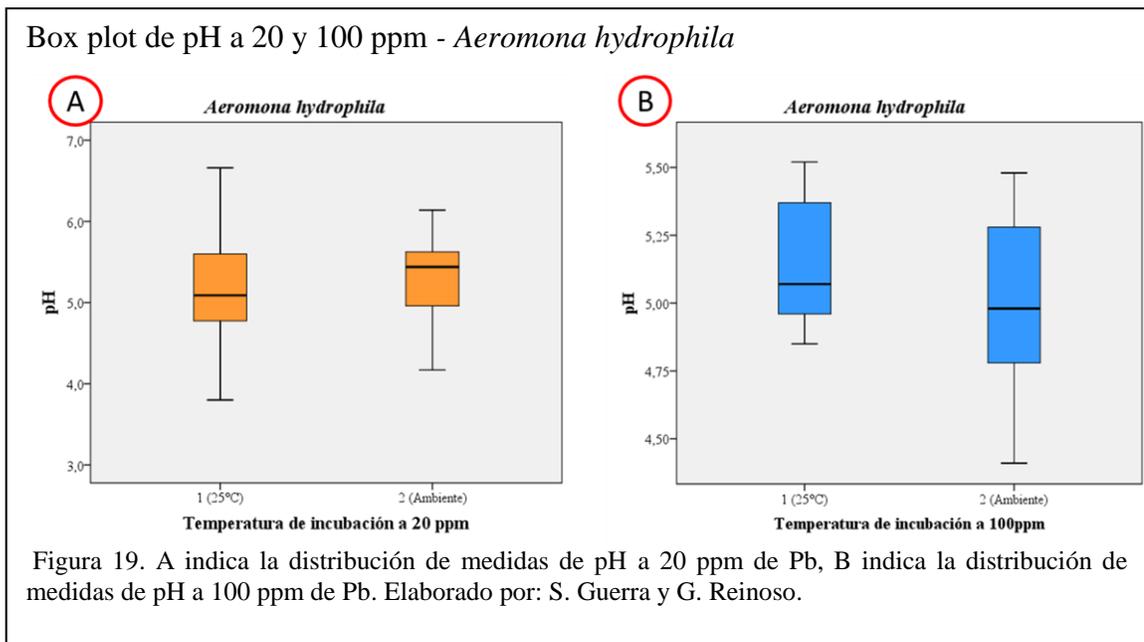
### Interpretación estadística de datos - *Aeromonas hydrophila*

En el Anexo 13 se indica los resultados de las pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para *Aeromonas hydrophila*, el análisis del nivel de significancia de esta prueba indicó un valor inferior al 0,05 para los datos de pH a 20 y 100 ppm y también para la temperatura interna de cultivo a 100 ppm, esto quiere decir que la prueba estadística para el análisis de las medidas de tendencia central a utilizar es la U de Mann Whitney. En la temperatura interna del cultivo a 20 ppm el nivel de significancia fue de 0,067 es decir mayor al nivel de significancia de 0,05 por esta razón para este grupo de datos se utilizó la prueba  $t_{Student}$ .

### Análisis estadístico de pH a 20 y 100 ppm - *Aeromonas hydrophila*

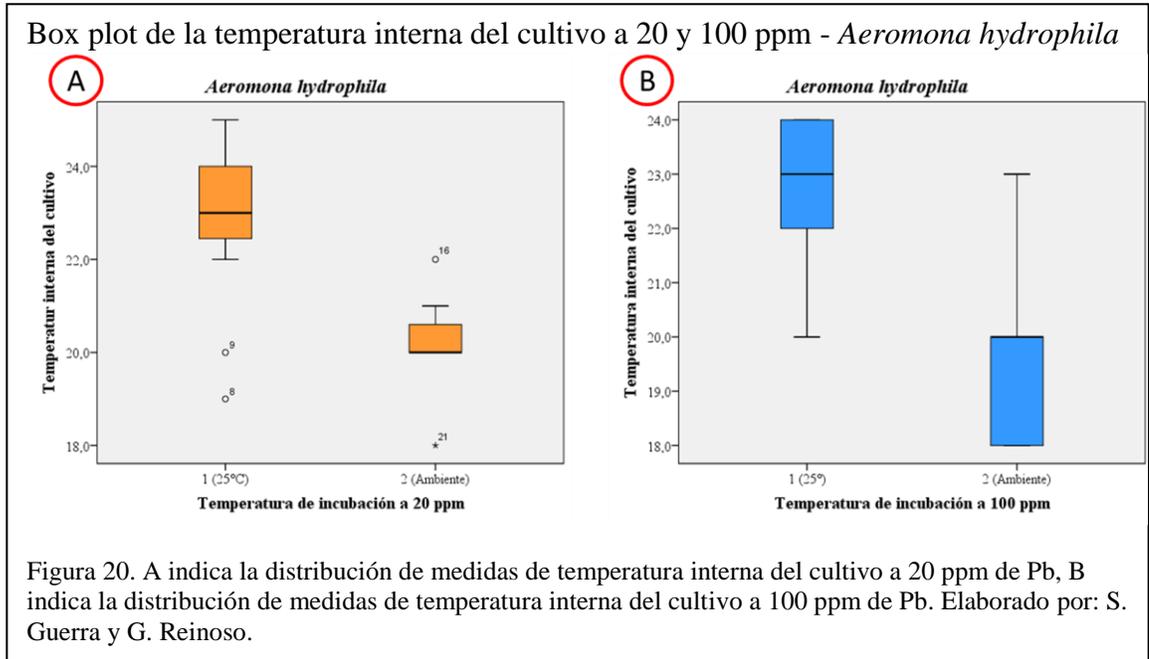
La Figura 19 muestra que a 20 ppm el comportamiento de los datos es diferente entre ambos bloques, para el bloque 1, el valor de la mediana calculado fue 5, el rango varió

entre un valor máximo de 7 y un valor mínimo de 4; en el bloque 2 el valor de la mediana calculado fue 5,4 y el rango de pH se encontró entre 4 y 6. A 100 ppm los datos de los dos bloques se comportan de manera similar, el rango para el bloque 1 varió entre un valor mínimo de 4,8 y un máximo de 5,5, el rango en el bloque 2 fue de 4,5 a 5,5; el valor de la mediana en el bloque 1 fue 5,1 y en el bloque 2 el valor calculado fue 4,9. Adicionalmente se realizó la prueba estadística U de Mann Whitney donde el valor de significancia bilateral asintótica para 20 ppm fue de 0,008 es decir, que las medias de los valores de pH son diferentes entre los bloque 1y 2. Mientras que a 100 ppm el valor de significancia asintótica bilateral fue de 1,000 lo que significa las medias de los valores de pH entre los 2 bloques analizados son iguales entre sí. (Ver Anexo 14).



*Análisis estadístico de la temperatura interna del cultivo a 20 y 100 ppm - Aeromona hydrophila*

La Figura 20 muestra que los datos de la temperatura interna del cultivo a 20 y 100 ppm tuvieron un comportamiento diferente entre los 2 bloques analizados, a 20 ppm el valor de la mediana para el bloque 1 fue 23°C, en el rango se obtuvo un valor máximo de 25°C y un valor mínimo de 22°C, se encontró también 2 valores atípicos que corresponden a las temperaturas de 19 y 20 °C. En el bloque 2 el valor de la mediana fue 20°C, el rango varió entre los valores de 20 y 21°C, se determinó también la presencia de 2 valores atípicos uno inferior de 18 °C y uno superior de 22°C. En el análisis a 100 ppm el valor de la mediana calculado para el bloque 1 fue 23°C en el rango se obtuvo un valor máximo de 24°C y un valor mínimo de 20°C; en el bloque 2 el valor de la mediana fue 20 °C con un rango comprendido entre los 18 y 23°C. La prueba estadística U de Mann Whitney para la temperatura interna del cultivo a 100 ppm indicó un nivel de significancia asintótica de 0.000 y el estadístico t calculado para la temperatura interna del cultivo a 20 ppm también indicó una significancia bilateral asintótica de 0,001. Lo que nos indica que las medias calculadas entre los dos bloques son diferentes entre sí (Ver Anexos 14 y 15).’



#### 4.7.5. Cepa 5. *Aeromona sp LPS01Pb1 (2) A*

##### *Coefficiente de correlación de Pearson - Aeromona sp*

En la Tabla 18 el coeficiente de Pearson indica que el crecimiento bacteriano de *Aeromona sp* tiene una relación directa con el tiempo de incubación de los 2 bloques, sobre todo para la concentración de 100 ppm y en menor porcentaje para 20 ppm; la temperatura interna del cultivo (TEMP) y el pH son independientes del crecimiento bacteriano; y la concentración de Pb en la muestra está influenciada de manera inversa por el crecimiento bacteriano a 100 ppm en los 2 bloques, mientras que, a 20 ppm se puede observar que el coeficiente de correlación entre el crecimiento bacteriano y la concentración de Pb es menor pero no despreciable.

Tabla 18.

Correlación de Pearson - *Aeromona sp*

Correlaciones de Pearson								
Log [ ]								
Concentración	Tiempo		TEMP		pH		Plomo	
	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente
20 ppm	0,77894	0,73713	-0,36539	-0,20945	0,18573	0,17448	-0,63915	-0,71352
100 ppm	0,95412	0,92619	0,23921	-0,05154	0,35552	0,34316	-0,94936	-0,94936

Nota: TEMP. Temperatura interna del cultivo. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

*Crecimiento bacteriano - Aeromona sp*

En la Tabla 19 se muestra que *Aeromona sp* crece con mayor facilidad a una concentración de 20 ppm en incubación a temperatura controlada de 25°C, ya que tiene una mayor velocidad de crecimiento, un mayor número de generaciones y un tiempo de generación menor. Mientras que en incubación a temperatura ambiente *Aeromona sp* crece con mayor facilidad a 100 ppm.

Tabla 19.

Crecimiento bacteriano - *Aeromona sp*

<i>Aeromona sp</i>						
Parámetro calculado	Símbología	Incubación 25 °C		Incubación ambiente		Unidades
		Concentración				
		20 ppm	100 ppm	20 ppm	100 ppm	
Area bajo la curva	A	1,69E+10	2,22E+10	3,15E+09	2,10E+10	u <sup>2</sup>
Velocidad de crecimiento	K	3,29E-02	2,92E-02	1,64E-02	3,17E-02	gen/hora
Tiempo de generación	g	3,04E+01	3,42E+01	6,11E+01	3,16E+01	horas
Número de generaciones	n	2,99	2,66	1,49	2,88	generaciones

Nota: S. Guerra y G. Reinoso.

## Crecimiento bacteriano – *Aeromonas* sp

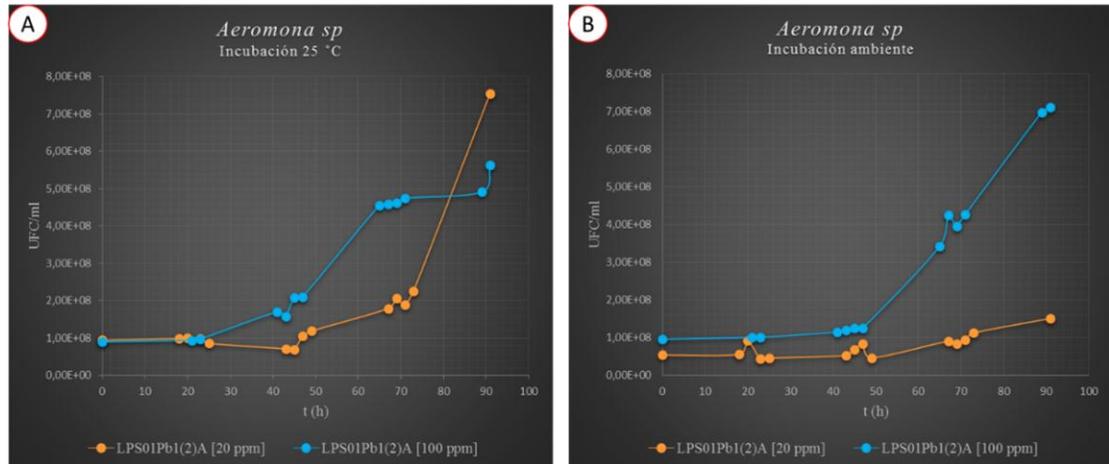


Figura 21. A indica el crecimiento bacteriano en incubación a temperatura controlada de 25°C, B indica el crecimiento bacteriano en incubación a temperatura ambiente. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

La Figura 21 muestra que *Aeromonas* sp a temperatura de incubación controlada de 25°C la fase de crecimiento exponencial para 100 ppm inició en la hora 24, y a 20 ppm empezó a partir de la hora 45. Mientras que, a temperatura de incubación ambiente se pudo evidenciar un mayor crecimiento bacteriano a 100 ppm, la fase de crecimiento exponencial de esta concentración está entre la hora 48 y la hora 90 del ensayo.

## Remoción de Pb - *Aeromonas* sp

La Figura 22 muestra que los valores más altos de remoción se registraron a 100 ppm en los 2 bloques analizados; 86,29% en el bloque 1 y 88,29% para el bloque 2. Mientras que a 20 ppm la máxima remoción alcanzó un valor del 66,8% a temperatura de incubación ambiente.

## Remoción de Plomo - *Aeromonas sp*

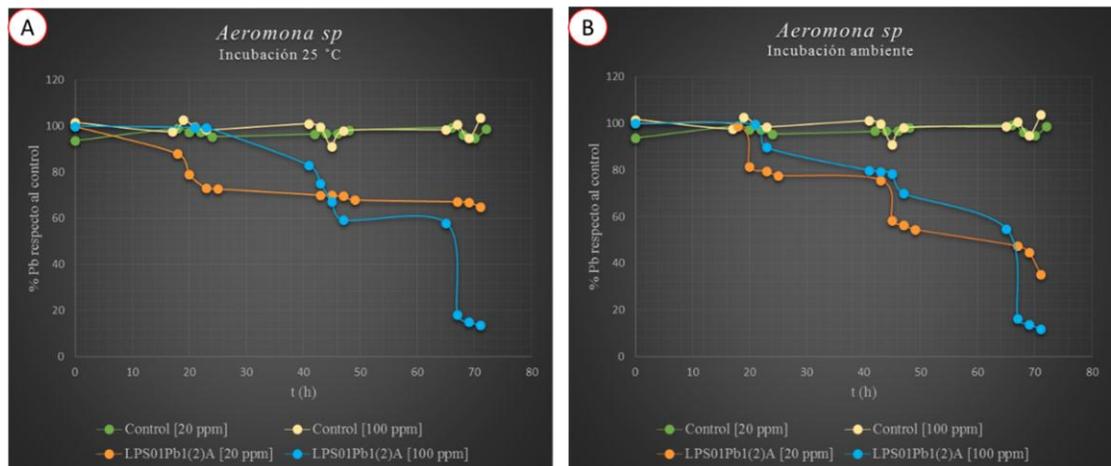


Figura 22. A indica la remoción de Pb en incubación a temperatura controlada de 25°C, B indica la remoción de Pb en incubación a temperatura ambiente. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

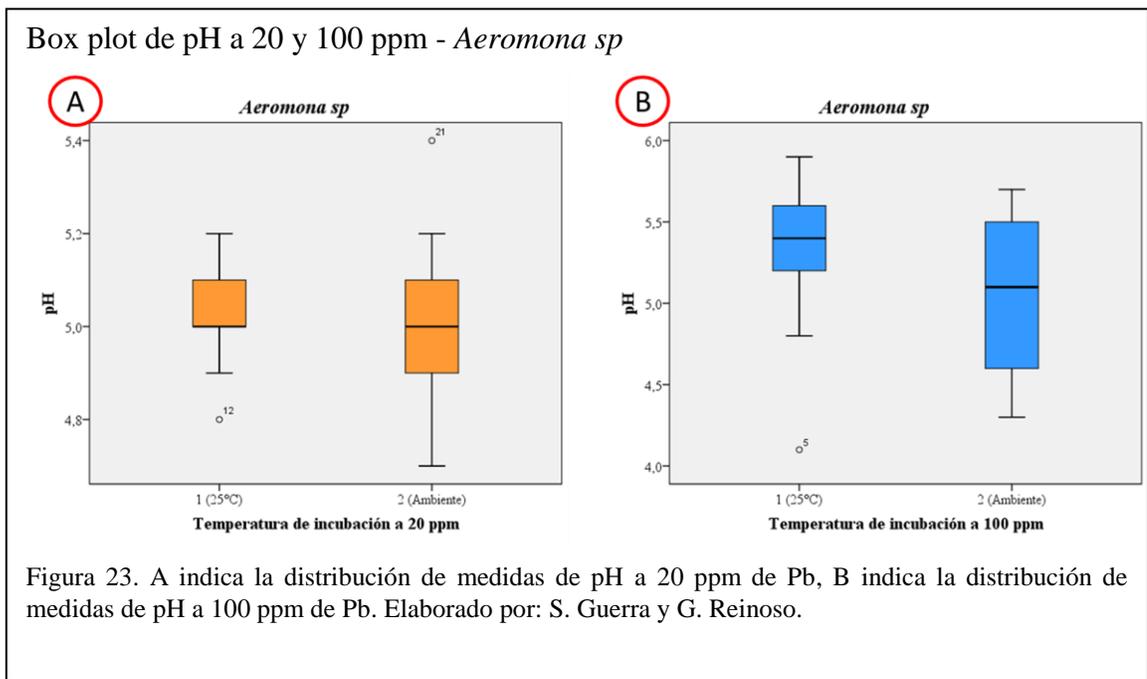
### Interpretación estadística de datos - *Aeromonas sp*

En el Anexo 16 se indica los resultados de las pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para *Aeromonas sp*, el análisis del nivel de significancia de esta prueba indicó un valor inferior al 0,05 para los datos de pH a 20 y 100 ppm y también para la temperatura interna de cultivo a 100 ppm, esto quiere decir que la prueba estadística para el análisis de medidas de tendencia central a utilizar es la U de Mann Whitney. En la temperatura interna del cultivo a 20 ppm el nivel de significancia fue de 0,103 es decir, mayor al nivel de significancia de 0,05 por esta razón para este grupo de datos se utilizó la prueba t\_Student.

### Análisis estadístico de pH a 20 y 100 ppm - *Aeromonas sp*

La Figura 23 muestra que a concentraciones de 20 ppm el comportamiento de los datos entre ambos bloques fue similar, para el bloque 1, el valor de la mediana calculado

fue 5, el rango varío entre un valor máximo de 5,2 y un valor mínimo de 4,9 con un valor atípico de 4,8; en el bloque 2 el valor de la mediana calculado fue 5 y el rango de pH se encontrado fue 4,7 y 5,2 con un valor atípico de 5,4. Para la concentración de 100 ppm los datos de los dos bloques también se comportan de manera similar, el rango para el bloque 1 varió entre un valor mínimo de 4,7 y un máximo de 5,9, también se encontró un valor atípico de 4,1; en el bloque 2 el rango fue de 4,4 a 5,7; el valor de la mediana en el bloque 1 fue 5,4 y en el bloque 2 el valor fue 5,1. En la prueba estadística U de Mann Whitney el valor de significancia bilateral asintótica para 20 ppm fue de 1,000 es decir, que las medias de los valores de pH son similares entre los bloque 1 y 2 y a 100 ppm el valor de significancia asintótica bilateral fue de 0,681 lo que significa las medias de los valores de pH entre los 2 bloques analizados también son similares entre sí. (Ver Anexo17).



*Análisis estadístico de la temperatura interna del cultivo a 20 y 100 ppm - Aeromonas sp*

La Figura 24 muestra que los datos de la temperatura interna del cultivo a 20 y 100 ppm tuvo un comportamiento diferente entre los 2 bloques analizados, a 20 ppm el valor de la mediana para el bloque 1 fue 21°C, en el rango se obtuvo un valor máximo de 26°C y un valor mínimo de 17°C; en el bloque 2 el valor de la mediana fue 20°C, el rango varió entre los valores de 18 y 25°C. En el análisis a 100 ppm el valor de la mediana calculado para el bloque 1 fue 24°C en el rango se obtuvo un valor máximo de 25°C y un valor mínimo de 23°C; en el bloque 2 el valor de la mediana fue 20°C y los valores del rango comprendidos entre los 18 y 22°C. La prueba estadística U de Mann Whitney para la temperatura interna del cultivo a 100 ppm indicó un nivel de significancia asintótica de 0.000 y el estadístico t calculado para la temperatura interna del cultivo a 20 ppm también indicó una significancia bilateral asintótica de 0,000. Lo que nos indica que las medias calculadas entre los dos bloques son diferentes entre sí (Ver Anexo 17 y 18).

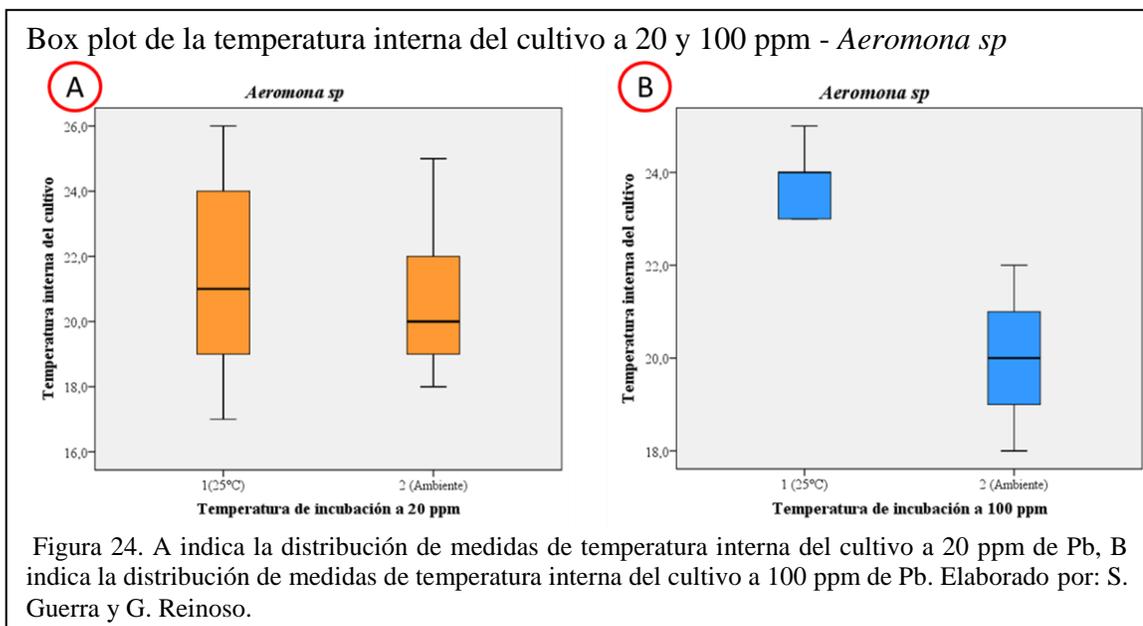


Tabla 20.

Resumen de crecimiento bacteriano a 20 y 100 ppm

Resumen de crecimiento bacteriano							
Cepa		<i>Acinetobacter sp</i>	<i>Photobacterium damsela</i>	<i>Pseudomona sp</i>	<i>Aeromona hydrophyla</i>	<i>Aeromona sp</i>	
20 ppm	25°C	K	6,06E-02	4,86E-02	4,87E-02	4,89E-02	3,29E-02
		g	1,65E+01	2,06E+01	2,05E+01	2,04E+01	3,04E+01
		n	5,46	4,37	3,46	3,47	2,99
	Ambiente	K	5,64E-02	4,06E-02	6,60E-02	6,84E-02	1,64E-02
		g	1,77E+01	2,46E+01	1,52E+01	1,46E+01	6,11E+01
		n	5,08	3,66	4,68	4,86	1,49
100 ppm	25°C	K	2,19E-02	4,78E-02	3,57E-02	3,21E-02	2,92E-02
		g	4,57E+01	2,09E+01	2,80E+01	3,12E+01	3,42E+01
		n	1,95	4,25	2,53	2,28	2,66
	Ambiente	K	1,55E-02	4,71E-02	2,29E-02	3,29E-02	3,17E-02
		g	6,46E+01	2,13E+01	4,37E+01	3,04E+01	3,16E+01
		n	1,38	4,19	1,63	2,33	2,88

Nota: Los círculos en azul indican los valores máximos del número de generaciones (n), la mayor velocidad de crecimiento (k) y el tiempo de generación más bajo (g). Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

Tabla 21.

Resumen de remoción de Pb a 20 y 100 ppm

Cepa	Resumen de remoción de Pb							
	20 ppm				100 ppm			
	% remocion		Concentración		% remocion		Concentración	
	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente	25°C	Ambiente
<i>Acinetobacter sp</i>	42,40%	41,90%	12,00	12,10	74,09%	94,57%	26,45	5,54
<i>Photobacterium damsela</i>	44,90%	88,50%	44,80	9,32	95,45%	87,82%	4,65	12,44
<i>Pseudomona asp</i>	52,00%	52,00%	10,00	10,00	44,47%	96,30%	56,70	4,05
<i>Aeromona hydrophyla</i>	27,50%	42,40%	15,09	11,98	57,84%	69,66%	43,05	30,98
<i>Aeromona sp</i>	35,00%	64,90%	13,50	7,31	86,29%	88,29%	14,00	11,96

Nota: El círculo en amarillo muestra el mayor porcentaje de remoción de las cinco bacterias ensayadas. Elaborado por: S. Guerra y G. Reinoso.

#### 4.8. Discusión de resultados obtenidos

En el presente estudio se analizó un total de 152 microorganismos entre cepas y consorcios bacterianos, de los cuales se seleccionaron cinco cepas (3.29%) en función de las características macro y microscópicas. Al realizar un análisis comparativo entre las

cinco cepas mencionadas anteriormente a las diferentes concentraciones y temperaturas experimentadas, se determinó que *Aeromona hydrophila* presentó una mayor facilidad de crecimiento a una concentración de 20 ppm a temperatura de incubación ambiente.

Como se muestra en la Tabla 20, esta bacteria obtuvo la mayor velocidad de crecimiento ( $K = 6,84E-2$ ) en un menor tiempo de generación ( $g=1,46E+01$ ) y el segundo número de generaciones ( $n = 4,86$ ) más alto, después de *Acinetobacter sp.* Este resultado corrobora lo expresado por Soto y colaboradores (2010), quienes afirman que *Aeromona hydrophila* es una bacteria que presenta una alta resistencia y/o tolerancia al plomo.

Adicionalmente, en su estudio Paniagua y colaboradores (2006) demostraron que la concentración mínima inhibitoria de Pb para bacterias de esta especie fue de 800 ppm, es decir, que se produce una reducción del crecimiento bacteriano conforme se incrementa la concentración del metal, lo cual podría atribuirse al estrés por metales pesados y su toxicidad.

Los resultados obtenidos al evaluar la capacidad bacteriana de remoción mostrados en la Tabla 21, indicaron que *Pseudomona sp* presentó un importante porcentaje de remoción de Pb (96.30%) a 100 ppm e incubación a temperatura ambiente, siendo la segunda cepa con mayor velocidad de crecimiento en un tiempo de generación menor. En su estudio Jaehong y colaboradores (2015), determinaron que las bacterias del género *Pseudomona* lograron remover hasta un 87% de Pb a una concentración de 100 ppm, y además mostró una tolerancia de hasta 400 ppm alcanzando un 61% de remoción. Con los resultados mencionados precedentemente se pudo comprobar lo mencionado por Torres (2003), quien afirma que el género *Pseudomona* es considerado como una de las

bacterias más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos y remoción de metales pesados.

El valor más alto de remoción de Pb para el caso de *Pseudomona sp* se obtuvo en un rango de pH que varió de fuertemente ácido a ligeramente ácido (4,2-6,1), el mismo que fue registrado a 100 ppm en incubación a temperatura ambiente que varió de 18 a 23 °C , esto concuerda con los resultados obtenidos en su estudio por Tur-Naranjo y colaboradores (2013), quienes lograron determinar que el mayor porcentaje eficiencia de remoción de Pb fue del 97,4% a pH 5,2 a una temperatura ambiente de 32°C.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, se analizó un total de 152 colonias bacterianas, en la fase de aislamiento y bioestimulación se seleccionaron 12 cepas morfológicamente diferentes, de las cuales seis cepas lograron adaptarse al medio de cultivo con Pb, presentando resistencia y/o tolerancia a las diferentes concentraciones experimentadas.

En los resultados de las pruebas bioquímicas del Kit Microgen GN-ID A+B para la identificación de bacterias resistentes al Pb, se pudo identificar los géneros: *Acinetobacter sp*, *Pseudomona sp*, *Aeromona sp* y las especies: *Photobacterium damsela* y *Aeromona hydrophila*, de las cuales únicamente *Photobacterium damsela* obtuvo el 99,8% de certeza, es decir, que presenta una gran aproximación a la especie, mientras que las otras cuatro cepas analizadas muestran una buena aproximación al género.

En el análisis de la cinética de crecimiento bacteriano se determinó que *Aeromona hydrophila* presentó una mayor facilidad de crecimiento a una concentración de 20 ppm a temperatura de incubación ambiente, debido a su mayor velocidad de crecimiento en un tiempo de generación menor.

En el análisis de la curva de remoción de Pb, *Pseudomona sp* registró un porcentaje de remoción del 96,30% a una concentración de 100 ppm e incubación a temperatura ambiente, siendo este valor el más alto de las cinco cepas ensayadas, es por esta razón que este género ha sido considerado como uno de los más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos y metales pesados.

## REFERENCIAS

- Acosta, I., Cárdenas, J., & Martínez, V. (2012). El uso de diferentes biomásas para la eliminación de metales pesados de sitios contaminados. *Ide@s CONCYTEG*, 7(85), 911–922.
- Ambuludi, A., & Hoyos, A. (2013). *Necesidad de reformar el Art. 11 de la Ley de Prevención y Control de la Contaminación Ambiental acerca de la responsabilidad por daños ambientales*. Uniuersidad Nacional de Loja. Retrieved from [http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/808/1/TESIS\\_FINAL.pdf](http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/808/1/TESIS_FINAL.pdf)
- American Water Works Association. (2002). *Calidad y tratamiento del agua*. (A. García, Ed.) (Quinta). Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U.
- American Water Works Association, American Public Health Association, & Water Pollution Control Federation. (1992). *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (Décimo sép). Madrid: Díaz de Santos.
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608.  
<http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bustos, A., Garzón, K., & Tamayo, J. (2015). *Aplicación de Indicadores de Gestión Ambiental para medir la contaminación por emisiones a la atmósfera y residuos sólidos generados por las empresas del sector de la industria metalúrgica en el DMQ en el periodo 2012-2013*. Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9814/1/QT07773.pdf>

- Castillo, L., & Barragán, B. (2011). Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, 4(2), 45–54. Retrieved from [http://servicios.encb.ipn.mx/revistaisa/Vol. 4 No. 2/Aplicaciones Biotecnológicas de Microorganismos Halófilos.pdf](http://servicios.encb.ipn.mx/revistaisa/Vol.4No.2/AplicacionesBiotecnologicasdeMicroorganismosHalofilos.pdf)
- Cervantes, C., Espino, A., Acevedo, F., León, I., Rivera, M., Avila, M., ... Moreno, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 203–210. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062v.pdf>
- Dos Santos, A. (2007). *Microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos*. Universidad Autónoma de Barcelona. Retrieved from <http://www.tdx.cat/bitstream/10803/5691/1/ajse1de1.pdf>
- Eróstegui Revilla, C. P. (2009). *Contaminación por metales pesados*. *Revista Científica Ciencia Médica SCEM*. Romero, Karla.
- Gadd, G. M. (2000). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 271–279. [http://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00095-1](http://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00095-1)
- García, J., Castells, X. E., & Gaya, J. (2012). *Impactos Ambientales y Energía* (Días de Sa). Madrid.
- González, E. (2011). Concepto y estrategias de biorremediación, 20–29. Retrieved from [csifsvr.uan.edu.co/index.php/ingean/article/download/96/PDF](http://csifsvr.uan.edu.co/index.php/ingean/article/download/96/PDF)
- Greenpeace. (2008). *Informe de Contaminación en España*. Barcelona. Retrieved from

<http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/contaminacion/contaminacion-en-espana.pdf>

Jaehong, S., Patrick, J. S., Ik-Boo, J., Byung, T. O., & Min, C. (2015). Potential of *Pseudomonas* sp. JH 51-2 to stabilize lead in mining site soil, *36*(May), 537–542.

Lock, D. H. (2009). Aplicaciones en la biometalurgia. *Revista de Química - Pontificia Universidad Católica Del Perú*, 25–30. Retrieved from <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/3453>

Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). *Brock. Biología de los Microorganismos* (Doceava ed). Madrid: Pearson Education Inc.

Martínez, G. (2010). Aplicación de las membranas líquidas soportadas a la separación de Cobalto y Níquel, 145.

Microgen Products, L. (2007). Microgen TM GnA + B-ID System.

Morales, B. (2012). Microorganismos en la Industria. Retrieved from <http://biotecindustrial.blogspot.com/>

Paniagua, G. L., Monroy, E., Perches, M., Negrete, E., García, O., & Vaca, S. (2006). Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from charal (*Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835). *Hidrobiología*, *16*(1), 75–79.

Peña, C., & Vanegas, G. (2010). *Dinámica de los suelos amazónicos: Procesos de degradación y alternativas para su recuperación*. Bogotá, Colombia: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - Sinchi.

- Pérez, T., Jiménez, C., & Valverde, C. (2004). Biomineralización bacteriana de magnetita y aplicaciones. *Seminario SEM 07*, (1), 58–74. Retrieved from [http://www.ehu.eus/sem/seminario\\_pdf/SEMINARIO\\_SEM\\_7\\_058.pdf](http://www.ehu.eus/sem/seminario_pdf/SEMINARIO_SEM_7_058.pdf)
- Prescott, Harley, & Klein. (2008). *Microbiología*. (J. Willey, L. Sherwood, & C. Woolverton, Eds.) (Séptima ed). Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España.
- Prieto, J., Gonzáles, C., Román, A., & Prieto, F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelo y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10, 29–44. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/939/93911243003.pdf>
- Ramírez, J. C., Ulloa, P., Velázquez, M., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, Año 2(7), 16. Retrieved from [http://www.hablemosclaro.org/repositorio/biblioteca/b\\_305\\_bacterias\\_lacticas\\_importancia\\_en\\_alimentos.pdf](http://www.hablemosclaro.org/repositorio/biblioteca/b_305_bacterias_lacticas_importancia_en_alimentos.pdf)
- Ramírez, L., & Coba, P. (2012). *Aislamiento, caracterización y conservación de bacterias no entéricas con capacidad de adaptación en altas concentraciones de plata, presentes en una laguna de sedimentación de la planta minera del sector El Pache - Portovelo - El Oro*. Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6630/1/UPS-QT04656.pdf>
- Riverón, E., Ramírez, N., Herrera, D., Barreras, G., Zayas, Á., & Regueiro, Á. (2012). Estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 43(2), 1–5.

- Rocha, E. (2000). Espectrometría de absorción atómica. *Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Autónoma de Chihuahua*, 123–203. Retrieved from [fcq.uach.mx/index.php/acerca-de/.../21-analisis-instrumental?download...](http://fcq.uach.mx/index.php/acerca-de/.../21-analisis-instrumental?download...)
- Rogers, K. (2011). Bacteria and Viruses. In *Biochemistry, cells and life* (Fisrt, p. 209). Britannica Educational Publishing.
- Safont, B. (2012). Biodegradación de fenol en un reactor en régimen de spouted bed con partículas de  $\beta$ -ciclodextrina, 362.
- Sala, L., García, S., González, J., Frascaroli, M., Bellú, S., Mangiameli, F., ... Peregrin, S. (2010). Biosorción para la eliminación de metales pesados en aguas de desecho. *Real Sociedad Española de Química. Química Y Medio Ambiente*, 106(2), 114–120.
- Sánchez, J., & Rodríguez, J. (2010). Fundamentos y Aspectos Microbiológicos: Biorremediación. *Universidad de Oviedo*, 1, 12–16.
- Silver, S., & Phung, L. T. (2005). A bacterial view of the periodic table: Genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(11-12), 587–605. <http://doi.org/10.1007/s10295-005-0019-6>
- Skoog, D. A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental* (Quinta edi). Madrid.
- Soto, C., Gutiérrez, S., Rey León, A., & González, E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *Grupo de Investigacion GRESIA*, 195–205. Retrieved from [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/NOVA14\\_ARTORIG6.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA14_ARTORIG6.pdf)

- Suárez, P., & Reyes, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*, 27, 160–164. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33906702>
- Torres, D. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas* -, 2, 1–5. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/540/54012219.pdf>
- Tórtora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Microbiology: an introduction 9th ed.* (Novena). Buenos Aires: Pearson Education Inc.
- Tur, E., Orbera, T., Álvarez, Y., & Pérez, R. (2013). Bioadsorción de plomo (II) por biomasa microbiana seca: Efectos del pH. *Revista Cubana de Química*, XXV(Li), 75–81. Retrieved from [https://www.researchgate.net/.../278028590\\_Bioadsorcion\\_de\\_plomo\\_II\\_p...](https://www.researchgate.net/.../278028590_Bioadsorcion_de_plomo_II_p...)
- Turcios, J., & García, G. (2010). *Determinación cuantitativa de arsénico, cobre, plomo y cadmio en (Brasica oleracea) brócoli que se cultiva en la parcela de San José. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.* Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Retrieved from [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2876.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2876.pdf)
- Vizcaíno, L., & Fuentes, N. (2015). Biosorción de Cd, Pb y Zn por biomasa pretratada de algas rojas, cáscara de naranja y tuna. *Ciencia E Ingeniería Granadina*, 25, 43–61. Retrieved from <http://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rcin/article/view/432/232>
- Volke, T. (2002). Biorremediación de suelos contaminados. *Centro Nacional De*

*Investigación Y Capacitación Ambiental*, 25–39. Retrieved from  
[http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2002\\_1/biorremediacion.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2002_1/biorremediacion.pdf)

Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2, 93–104. Retrieved from  
<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm>

## ANEXOS

Anexo 1. Referencia de Sustratos Kit Microgen GN-ID A+B

Pocillo	Reacción	Descripción	Positiva	Negativa
1	Lisina	La Lisina decarboxilasa – al azul de Bromotimol pasa de verde/azul, indicando la producción de la amina cadaverina.	Verde / Azul	Amarillo
2	Ornitina	La Ornitina decarboxilasa – el azul de Bromotimol se mantiene azul indicando la producción de la amina putrescina.	Azul	Amarillo / Verde
3	H <sub>2</sub> S	Producción de H <sub>2</sub> S – el Tiosulfato se reduce a H <sub>2</sub> S que reacciona con las sales de hierro produciendo un precipitado negro.	Marrón/ Negro	Color paja
4	Glucosa	Fermentación el azul de Bromotimol cambia de azul a amarillo como resultado de la producción de ácido a partir de la fermentación de carbohidratos.	Amarillo	Azul / Verde
5	Manitol			
6	Xilosa			
7	ONPG	Hidrólisis – la hidrólisis de la ONPG por la Bgalactosidasa da lugar a la producción de amarillo de orto-nitrofenol.	Amarillo	Incoloro
8	Indol	El indol se produce a partir de triptófano y da lugar a un complejo rosa / rojo cuando se añade el reactivo de Kovac's.	Rosa / Rojo	Incoloro
9	Ureasa	La hidrólisis de la urea da lugar a la formación de amoníaco que provoca un incremento de pH que hace virar el rojo de fenol de amarillo a rosa / rojo.	Rosa muy profundo	De color paja a rosa salmón pálido
10	V.P.	La producción de acetoina a partir de glucosa se detecta por la formación de un complejo rosa / rojo después de la adición de alfa naftol y creatina en presencia de KOH.	Rosa profundo / Rojo	Incoloro a rosa pálido
11	Citrato	La utilización de citrato (solo como fuente de carbono) da lugar a un incremento de pH que proporciona un cambio de color del azul de bromotimol de verde a azul.	Azul	Amarillo/ Verde pálido
12	TDA	El ácido Indolpirúvico se produce a partir de triptófano por la triptófano deaminasa dando un color rojo cereza cuando se añaden los iones de hierro. Los microorganismos indolo positivos pueden dar coloración marrón – en caso de resultado negativo.	Rojo cereza	Color paja
13	Gelatina	Los enzimas proteolíticos licuan la gelatina dando lugar a partículas negras que quedarán dispersadas por el pocillo.	Negro	Incoloro

14 Malonato Cuando el malonato sódico es la única fuente de carbono se inhibe la conversión del ácido succínico a ácido fumárico. Un microorganismo incapaz de usar ese sustrato da lugar a la acumulación de ácido succínico y el microorganismo no crece. Una reacción positiva es resultado de la utilización de malonato sódico a la vez que el sulfato de amonio se utiliza como fuente de nitrógeno dando lugar a hidróxido sódico que aumentará la alcalinidad dando color azul. Azul Verde

15	Inositol		
16	Sorbitol		
17	Ramnosá		
18	Sacarosa		
19	Lactosa	Fermentación – el azul de Bromotimol cambia de azul a amarillo como resultado de la producción de ácido por la fermentación de carbohidratos.	Amarillo Azul
20	Arabinosa		
21	Adonitol		
22	Rafinosa		
23	Salicina		
24	Arginina		

Anexo 2. Carta de colores Kit Microgen GN-ID A+B

Microgen™ GN A ID

WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7
Reaction	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Nitrate
Negative													
Positive													

Microgen™ GN B ID

WELL/NAPFCHEN /GODET	13								Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine 24hrs	Arginine 48hrs
Negative													
Positive													

CAUTION: Keep out of direct sunlight. Due to laminate discolouration and paper ageing, the colours on this chart will change.

These colours are provided as general guide to the range of test colours.

Legend:

- Appropriate reagents to be added prior to reading.
- Overlaid with sterile mineral oil.
- Not overlaid with oil for oxidase positive organism.



Microgen Bioproducts Limited, 1 Admiralty Way, Camberley Surrey GU15 3DT UK



## GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No.:  
CD M2 O1

Specimen Type: Bacteria  
Date: 26/11/2015

Well Number	GN A wells												GN B wells														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	0			4			1			0			0			0			0			0			3		

Octal Code: \_\_\_\_\_ Final Identification: Acinetobacter sp. 50,7%

WF6125/08/03

## GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No.:  
REC4P62(1)A

Specimen Type: Bacteria  
Date: 27/11/2015

Well Number	GN A wells												GN B wells														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	5			4			4			0			0			0			0			1					

Octal Code: \_\_\_\_\_ Final Identification: Photobacterium damsela 99,8%

WF6125/08/03

# GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No.:  
**LPS DICr1**

Specimen Type: **Bacteria**

Date: **27/11/2015**

Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose.	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Result	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	<b>5</b>			<b>4</b>			<b>1</b>			<b>4</b>			<b>0</b>			<b>0</b>			<b>0</b>			<b>0</b>			<b>1</b>		

Octal Code: \_\_\_\_\_

Final Identification: **Pseudomona sp 56,1%**

WF6125/08/03

# GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No.:  
**MSPb2(2)A**

Specimen Type: **Bacteria**

Date: **27/11/2015**

Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose.	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Result	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	<b>5</b>			<b>2</b>			<b>7</b>			<b>6</b>			<b>2</b>			<b>6</b>			<b>7</b>			<b>3</b>			<b>7</b>		

Octal Code: \_\_\_\_\_

Final Identification: **Aeromona hydrophila 93,8%**

WF6125/08/03

# GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No.  
LPSO1PB1(2)A

Specimen Type: Bacteria  
Date: 27/11/2015

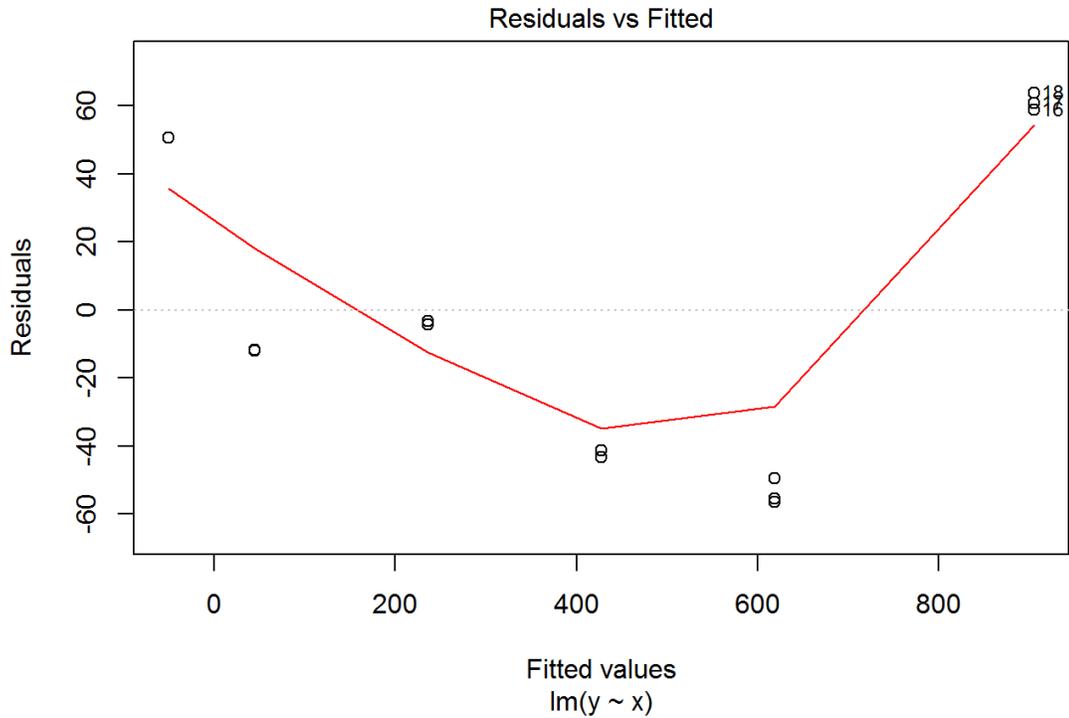
Well Number				GN A wells												GN B wells														
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine			
Result	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+			
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	5			0			6			0			4			0			3			2			1					

Octal Code: \_\_\_\_\_ Final Identification: \_\_\_\_\_

Aeromonas sp 64,5 %

WF6125/08/03

Anexo 4. Curva de análisis de residuos.



Anexo 5. Pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para *Acinetobacter sp*

Pruebas de Normalidad						
Shapiro - Wilk						
Concentración	Parámetro	Estadístico	gl	Sig.	Condición	Prueba Estadística
20 ppm	pH	,910	28	,020	No es Normal	U de Mann Whitney
	TEMP	,954	28	,253	Normal	t-student
100 ppm	pH	,724	28	,000	No es Normal	U de Mann Whitney
	TEMP	,941	28	,116	Normal	t-student

Anexo 6. Prueba U de Mann Whitney para *Acinetobacter sp*

U de Mann Whitney								
Rangos				Estadísticos de prueba <sup>a</sup>				
Concentración	T_inc	N	Rango promedio	Suma de rangos	U de Mann-Whitney	Z	Sig. asintótica (bilateral)	
20 ppm	pH	1	14	19,32	270,50	30,500	-3,195	
		2	14	9,68	135,50			
	Total	28						
100 ppm	pH	1	14	16,68	233,50	67,500	-1,591	
		2	14	12,32	172,50			
	Total	28						

Anexo 7. Prueba t de Student de la temperatura interna del cultivo para *Acinetobacter sp*

Prueba t de student para la igualdad de medias									
Concentración	Varianzas	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
							Inferior	Superior	
20 ppm	TEMP	Se asumen varianzas iguales	3,732	26	,001	2,30714	,61814	1,03655	3,57774
		No se asumen varianzas iguales	3,732	25,995	,001	2,30714	,61814	1,03654	3,57775
100 ppm	TEMP	Se asumen varianzas iguales	6,928	26	,000	3,42860	,49490	2,41130	4,44580
		No se asumen varianzas iguales	6,928	23,920	,000	3,42860	,49490	2,40700	4,45010

Anexo 8. Pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para *Photobacterium damsela*

Pruebas de Normalidad						
Shapiro - Wilk						
Concentración	Parámetro	Estadístico	gl	Sig.	Condición	Prueba Estadística
20 ppm	pH	,848	28	,001	No es Normal	U de Mann Whitney
	TEMP	,911	28	,021	No es Normal	U de Mann Whitney
100 ppm	pH	,724	28	,000	No es Normal	U de Mann Whitney
	TEMP	,941	28	,116	Normal	t-student

Anexo 9. Pruebas U de Mann Whitney para *Photobacterium damsela*

U de Mann Whitney								
Rangos				Estadísticos de prueba <sup>a</sup>				
Concentración	T_inc	N	Rango promedio	Suma de rangos	U de Mann-Whitney	Z	Sig. asintótica (bilateral)	
20 ppm	pH	1	14	15,57	218,00	83,000	-0,711	,477
		2	14	13,43	188,00			
		Total	28					
	TEMP	1	14	19,61	274,50	26,500	-3,326	,001
		2	14	9,39	131,50			
		Total	28					
100 ppm	pH	1	14	14,79	207,00	94,000	2,100	0,834
		2	14	14,21	199,00			
	Total		28					

Anexo 10. Prueba t de Student para *Photobacterium damsela*

Prueba t de student para la igualdad de medias									
Concentración	Varianzas	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
							Inferior	Superior	
100 ppm	TEMP	Se asumen varianzas iguales	6,328	26	,000	3,42860	,54180	2,31490	4,54230
		No se asumen varianzas iguales	6,328	24,455	,000	3,42860	,54180	2,31140	4,54570

Anexo 11. Pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para *Pseudomona sp*

Pruebas de Normalidad						
Shapiro - Wilk						
Concentración	Parámetro	Estadístico	gl	Sig.	Condición	Prueba Estadística
20 ppm	pH	,732	22	,000	No es Normal	U de Mann Whitney
	TEMP	,911	22	,049	No es Normal	U de Mann Whitey
100 ppm	pH	,419	28	,000	No es Normal	U de Mann Whitmey
	TEMP	,886	28	,005	No es Normal	U de Mann Whitmey

Anexo 12. Pruebas U de Mann Whitney para *Pseudomona sp*

U de Mann Whitney								
Rangos				Estadísticos de prueba <sup>a</sup>				
Concentración	T_inc	N	Rango promedio	Suma de rangos	U de Mann-Whitney	Z	Sig. asintótica (bilateral)	
20 ppm	pH	1	11	8,05	88,50	22,500	-2,917	,004
		2	11	14,95	164,50			
		Total	22					
	TEMP	1	11	16,64	183,00	4,000	-3,770	,000
		2	11	6,36	70,00			
		Total	22					
100 ppm	pH	1	13	13,00	169,00	78,000	-1,000	0,317
		2	13	14,00	182,00			
		Total	26					
	TEMP	1	13	18,50	240,50	19,500	-3,401	0,001
		2	13	8,50	110,50			
		Total						

Anexo 13. Pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para *Aeromonas hydrophila*

Pruebas de Normalidad						
Shapiro - Wilk						
Concentración	Parámetro	Estadístico	gl	Sig.	Condición	Prueba Estadística
20 ppm	pH	,707	22	,000	No es Normal	U de Mann Whitney
	TEMP	,917	22	,067	Normal	t-student
100 ppm	pH	,419	28	,000	No es Normal	U de Mann Whitney
	TEMP	,886	28	,005	No es Normal	U de Mann Whitney

Anexo 14. Pruebas U de Mann Whitney para *Aeromonas hydrophila*

U de Mann Whitney								
Rangos				Estadísticos de prueba <sup>a</sup>				
Concentración	T_inc	N	Rango promedio	Suma de rangos	U de Mann-Whitney	Z	Sig. asintótica (bilateral)	
20 ppm	pH	1	11	8,45	93,00	27,000	-2,665	,008
		2	11	14,55	160,00			
	Total		22					
100 ppm	pH	1	13	13,50	175,50	84,500	0,000	1,000
		2	13	13,50	275,50			
	Total		26					
	TEMP	1	13	18,73	243,50	16,500	-3,558	0,000
		2	13	8,27	107,50			
Total		26						

Anexo 15. Prueba t de Student para *Aeromonas hydrophila*

Prueba t de student para la igualdad de medias									
Concentración	Varianzas	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
							Inferior	Superior	
20 ppm	TEMP	Se asumen varianzas iguales	4,153	20	,000	2,70000	,6502	1,34380	4,05620
		No se asumen varianzas iguales	4,153	14,873	,001	2,70000	,6502	1,31320	4,08680

Anexo 16. Pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para *Aeromonas sp*

Pruebas de Normalidad						
Shapiro - Wilk						
Concentración	Parámetro	Estadístico	gl	Sig.	Condición	Prueba Estadística
20 ppm	pH	,327	28	,000	No es Normal	U de Mann Whitney
	TEMP	,939	28	,103	Normal	t-student
100 ppm	pH	,638	28,000	,000	No es Normal	U de Mann Whitney
	TEMP	,912	28,000	,023	No es Normal	U de Mann Whitney

Anexo 17. Pruebas U de Mann Whitney para *Aeromona sp*

U de Mann Whitney								
Rangos			Estadísticos de prueba <sup>a</sup>					
Concentración	T_inc	N	Rango promedio	Suma de rangos	U de Mann-Whitney	Z	Sig. asintótica (bilateral)	
20 ppm	pH	1	14	14,50	203,00	98,000	0,000	1,000
		2	14	14,50	203,00			
	Total		28					
100 ppm	pH	1	13	13,92	181,00	79,000	-0,411	0,681
		2	13	13,08	170,00			
	Total		26					
	TEMP	1	13	20,00	260,00	0,000	-4,381	0,000
		2	13	7,00	91,00			
Total		26						

Anexo 18. Pruebas t de Student para *Aeromona sp*

Prueba t de student para la igualdad de medias									
Concentración	Varianzas	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
							Inferior	Superior	
20 ppm	TEMP	Se asumen varianzas iguales	6,462	26	,000	3,7714	0,5837	2,5717	4,9712
		No se asumen varianzas iguales	6,462	25,916	,000	3,7714	0,5837	2,5715	4,9714