

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA AMBIENTAL**

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

**TEMA:
INSOLUBILIZACIÓN BIOLÓGICA DEL CROMO EN AGUAS
RESIDUALES DE LA INDUSTRIA DE CURTIEMBRE**

**AUTORES:
LIZETH SAMANTHA PARDO VILCACUNDO
MAURICIO ALEXIS PÉREZ ALBORNOZ**

**TUTOR:
PATRICIA MARIBEL GUTIÉRREZ SALAZAR**

Quito, julio del 2019

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotros, Lizeth Samantha Pardo Vilcacundo con documento de identificación N° 172398611-1 y Mauricio Alexis Pérez Albornoz con documento de identificación N° 172350817-0, 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: Insolubilización Biológica del Cromo en Aguas Residuales de la Industria de Curtiembre, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera e Ingeniero Ambientales, 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, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....
Lizeth Samantha Pardo Vilcacundo

172398611-1



.....
Mauricio Alexis Pérez Albornoz

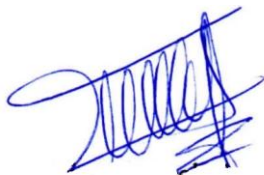
172350817-0

Fecha: Julio, 2019

DECLARATORIA DE COAUTORÍA DEL DOCENTE TUTOR

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo experimental, Insolubilización Biológica del Cromo en Aguas Residuales de la Industria de Curtiembre, realizado por Lizeth Samantha Pardo Vilcacundo y Mauricio Alexis Pérez Albornoz, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, julio 2019



.....
Patricia Maribel Gutiérrez Salazar

C.I. 171842722-0

DEDICATORIA

A mi madre por brindarme su amor y apoyo incondicional, en cada etapa de mi vida, todos mis triunfos serán para ti. Tú has sido el pilar fundamental, sobre el cual he crecido, tu hermoso corazón me ha guiado desde niña y ha forjado en mí un camino. Gracias por inculcarme todos los valores morales y éticos que poseo y aconsejarme sobre los que debo mejorar; por tus regaños, preocupaciones y consejos sin los cuales no sería la persona que soy ahora. Te agradezco infinitamente por tanto amor y por todos los puntos que tuviste que poner en pausa en tu vida para poder crecer junto a mí.

A mi padre por el esfuerzo que demuestra cada día para que nunca me falte nada y pueda cumplir todos mis propósitos; por sus cuidados y sus sacrificios, los cuales me han enseñado a no rendirme ante las adversidades, buscar dar lo mejor de mí y superarme en cada situación, siempre con la mejor actitud. Agradezco las risas y el cariño que me has demostrado todos estos años, por tu perseverancia y fortaleza, los cuales son un ejemplo para mí.

Para mi hermano, la persona que más amo en el mundo, por ser el mejor amigo que se pueda tener, ayudarme, aconsejarme, cuidarme, y estar conmigo en los buenos y malos momentos. Gracias por las risas, discusiones, juegos, llantos, salidas, noches de estudio y demás momentos compartidos, sin ti no lo habría logrado, eres la luz en mi vida.

A ti mi Dios por mantener a las personas que amo conmigo y permitirme llegar a este punto, esperando poder continuar con mis sueños, ya que me has dado todo lo necesario para ser feliz.

Dedico también a todas las personas y amigos que han formado parte de esta hermosa experiencia que ha sido la universidad, por todos los momentos vividos que guardo con mucho cariño en mi corazón.

Lizeth Samantha Pardo Vilcacundo

Dedico de una manera especial a mi abuelita Aida que ha sido la persona que me educó con todos los valores éticos y se ha convertido en una gran ayuda e inspiración a lo largo de estos años de edificación de mi vida profesional, ha sido su alma caritativa y su enorme corazón que me han sostenido y ayudado a ser una mejor persona cada día. Y también dedicado para mi tía Marianela, fiel compañía de mi abuelita, te agradezco por tus grandes oraciones y buenos deseos a lo largo de mi carrera, fue real y muchas gracias, me dieron muchos ánimos de seguir adelante.

A ti mi Dios todopoderoso que me has regalado la vida, la vitalidad y el valor para llegar a este instante importante de mi vida, para proteger el paraíso que has creado aquí en la Tierra. Que nunca me falte tu compañía, tu bendición y tu amor infinito.

A mi madre, compañera eterna de mi vida, te agradezco por tus grandes consejos y palabras a lo largo de mis días. Eres mi inspiración, admiración y mi único aliento, gracias por ese cariño incondicional y amor sin fronteras, te amo.

Para mi padre, gran ejemplo de vida, con espíritu incansable y un enorme corazón. Te doy las gracias por enseñarme desde hablar hasta vivir bien en este mundo y por brindarme todo hasta en los tiempos más difíciles. Te voy a amar hasta el final de mis días.

Y para mi pequeño gran hermanito que siempre ha sabido apoyarme en cualquier necesidad, sin su apoyo incondicional y amor no hubiera llegado hasta aquí, muchas gracias por todo y cuenta conmigo siempre.

Dedicado a las chicas que marcaron mi existencia en estos años de Universidad y son Ale, Vivi, Karen, Anahí, Tatto y Andre, gracias por todas las risas y experiencias vividas las quiero ♥

Dedicado a mi mejor amiga y ahora oficialmente colega, *Sami Pardo*. Por aguantar y luchar estos meses junto a mí al realizar este trabajo, sin duda alguna eres la mejor personita que he conocido y te deseo éxitos en la vida profesional y personal. Sabes que podremos estar muy lejos pero siempre estarás en mi corazón, cuenta conmigo por la eternidad.

Con mi más sincero amor,

Mauricio Alexis Pérez Albornoz.

AGRADECIMIENTO

Primero, el agradecimiento a Dios por darnos desde el principio y cada día muchas fuerzas para continuar y no decaer en el camino.

Agradecemos a nuestras familias respectivas que sin su apoyo incondicional hacia todas las necesidades que surgieron en el camino no lo hubiéramos logrado.

Deseamos manifestar un agradecimiento para los ingenieros e ingenieras que ayudaron con ideas y soluciones para este trabajo de titulación, en especial a Patricia Gutiérrez nuestra tutora que nos supo guiar hasta el final para lograr lo que nos habíamos propuesto. Un agradecimiento al Ingeniero Renato Sánchez por toda la ayuda ofrecida durante la realización de este trabajo experimental.

Un especial agradecimiento para el equipo de coordinación de los laboratorios de la UPS Sede Quito-Campus Sur; Verito, Carlitos y Víctor, que nos supieron guiar y facilitar todos los materiales y equipos requeridos para la elaboración de la presente investigación.

Agradecemos a Eduardo Serrano por abrirnos las puertas de curtiduría Serrano para realizar la investigación, siempre con una sonrisa y con la predisposición de ayudar a dos investigadores que necesitaban de mucho apoyo.

Agradecemos también de manera especial a nuestros amigos con los que sin duda hemos compartido mil y un aventuras a lo largo de esta carrera, muchas gracias a todos por la confianza y la amistad brindada. Para: Dany, Nico, Vivi, Ale, Karen, Anahí, Andre, Tatto, Wilson, Chris y Neo los queremos mucho.

Samii y Mau.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivo general	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. Marco Teórico.....	5
3.1. Industria curtiembre.....	5
3.1.1. Curtido	5
3.1.1.1. <i>Características de las aguas de curtido</i>	7
3.1.2. Cromo	7
3.1.3. Impactos del Cromo.....	8
3.1.3.1. <i>Legislación ambiental aplicable al cromo</i>	8
3.1.4. Tratamiento al Agua Residual.....	9
3.1.4.1. <i>Tipos de tratamiento</i>	9
3.1.4.1.1. Tratamiento primario	9
3.1.4.1.2. Tratamiento secundario.....	10
3.1.4.1.3. Tratamiento terciario.....	10
3.2. Biorremediación	10
3.2.1. Biorremediación con Bacterias	11
3.2.1.1. <i>Insolubilización biológica del cromo</i>	11
3.2.1.1.1. Bioprospección	11
3.2.2. Ventajas de la biorremediación con bacterias	11

3.3.	Cinética Bacteriana	12
3.3.1.	Curva de crecimiento bacteriano	12
3.3.1.1.	<i>Fase de Latencia</i>	12
3.3.1.2.	<i>Fase Exponencial</i>	12
3.3.1.3.	<i>Fase Estacionaria</i>	13
3.3.1.4.	<i>Fase de Muerte</i>	13
3.3.2.	Matemáticas de crecimiento	13
3.4.	Métodos.....	15
3.4.1.	Medios de Cultivo	15
3.4.1.1.	<i>Tipos de Medios de Cultivo</i>	15
3.4.2.	Pruebas Bioquímicas.....	16
3.4.3.	Kit Microgen GN ID A+B	16
3.4.4.	Nefelometría	17
3.4.5.	Índice de McFarland	17
3.4.6.	Control experimental	18
4.	Materiales y Métodos	19
4.1.	Descripción del área de estudio	19
4.1.1.	Curtiduría Serrano	19
4.1.2.	Localización	19
4.2.	Muestreo.....	20
4.3.	Caracterización bioquímica del agua	21

4.3.1.	Sólidos totales, volátiles y fijos	21
4.3.1.1.	<i>Preparación de Crisoles</i>	21
4.3.1.2.	<i>Procesamiento de la Muestra</i>	21
4.3.1.3.	<i>Determinación de sólidos fijos</i>	22
4.3.2.	pH, Conductividad y Oxígeno Disuelto	23
4.3.3.	Demanda Química de Oxígeno (DQO)	23
4.3.4.	Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅).....	24
4.3.5.	Determinación color del agua	25
4.4.	Determinación de cromo en el agua residual	26
4.4.1.	Preparación de soluciones	26
4.4.2.	Curva de calibración de cromo hexavalente	27
4.4.3.	Barrido espectrofotométrico.....	27
4.4.4.	Curva de calibración	28
4.4.5.	Digestión y Tratamiento de la muestra	29
4.5.	Bioestimulación	30
4.5.1.	Preparación de Medios.....	30
4.5.1.1.	<i>Caldo TSB</i>	30
4.5.1.2.	<i>Agar Cetrimida</i>	31
4.5.1.2.1.	Siembra en Agar Cetrimida.....	31
4.5.1.3.	<i>Agar TSA</i>	32
4.5.1.3.1.	Siembra en Agar TSA.....	32

4.5.1.4.	<i>Aislamiento Agar TSA y Cetrimida</i>	32
4.6.	Identificación Microbiana	33
4.6.1.	Tinción Gram	33
4.6.2.	Preparación de Muestra Madre.....	33
4.6.3.	Dilución y Conteo Bacteriano	34
4.6.4.	Pruebas Bioquímicas.....	35
4.6.4.1.	<i>Prueba de Oxidasa</i>	35
4.6.4.2.	<i>Preparación del reactivo de Kovacs</i>	35
4.6.4.3.	<i>Prueba en medio SIM (Sulfuro, Indol, Motilidad)</i>	36
4.6.4.4.	<i>Kit Microgen GN ID A+B</i>	36
4.6.4.4.1.	Inoculación e Incubaciones.	36
4.6.4.4.2.	Lectura y Adición de Reactivos.....	38
4.7.	Análisis de crecimiento bacteriano	39
4.7.1.	Elaboración de la curva de calibración McFarland	39
4.8.	Experimento	40
4.8.1.	Controles para el experimento.....	40
4.8.1.1.	<i>Control positivo</i>	40
4.8.1.2.	<i>Control negativo</i>	40
5.	Resultados y Discusión	42
5.1.	Muestras	42
5.2.	Caracterización Bioquímica del Agua	42

5.2.1.	Demanda Bioquímica de Oxígeno.....	43
5.2.2.	Sólidos en el agua residual.....	44
5.2.2.1.	<i>Sólidos Totales (ST)</i>	44
5.2.2.2.	<i>SFT (Solidos Fijos Totales)</i>	45
5.2.2.3.	<i>Cálculo SVT (Solidos Volátiles Totales)</i>	45
5.2.2.4.	<i>Sólidos Disueltos Totales (SDT)</i>	46
5.2.2.5.	<i>Sólidos Sedimentables (SS)</i>	46
5.2.2.6.	<i>Humedad de la muestra</i>	46
5.3.	Identificación Microbiana.....	46
5.3.1.	Recuento Bacteriano.....	48
5.3.2.	Curva de Calibración McFarland.....	49
5.3.3.	Prueba de Oxidasa.....	50
5.3.4.	Prueba de Sulfuro, Indol y Motilidad.....	51
5.3.5.	Prueba con kit de pruebas bioquímicas.....	52
5.4.	Control positivo.....	53
5.4.1.	Crecimiento Bacteriano.....	53
5.4.1.1.	<i>Hafnia alvei</i>	53
5.4.1.2.	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	55
5.4.1.3.	<i>Pseudomona fluorescens</i>	56
5.4.1.4.	<i>Pseudomona stutzeri</i>	57
5.5.	Control negativo.....	58

5.6.	Curvas de Crecimiento Bacteriano	60
5.6.1.	Hafnia alvei	60
5.6.1.1.	Control positivo.....	60
5.6.2.	Acinetobacter lwoffii	62
5.6.2.1.	Control positivo.....	62
5.6.3.	Pseudomona fluorescens	63
5.6.3.1.	Control positivo.....	64
5.6.4.	Pseudomona stutzeri	65
5.6.4.1.	Control positivo.....	65
5.7.	Curvas de reducción del cromo hexavalente.....	66
5.7.1.	Hafnia alvei	67
5.7.1.1.	Control positivo.....	67
5.7.2.	Acinetobacter lwoffii	69
5.7.2.1.	Control positivo.....	69
5.7.3.	Pseudomona fluorescens	71
5.7.3.1.	Control positivo.....	71
5.7.4.	Pseudomona stutzeri	73
5.7.4.1.	Control positivo.....	73
5.8.	Resumen Crecimiento Bacteriano	74
5.9.	Resumen Reducción de Cromo VI	76
5.10.	Tratamiento estadístico de los datos.....	77

5.10.1.	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk	77
5.10.2.	ANOVA.....	78
5.10.3.	Prueba de Tukey	79
5.10.4.	Diagrama de caja y bigotes.....	80
6.	Conclusiones y Recomendaciones	82
6.1.	Conclusiones	82
6.2.	Recomendaciones	83
7.	Bibliografía.....	84
8.	Anexos.....	94

ÍNDICE DE ANEXOS

8.1.	Anexo 1	94
8.2.	Anexo 2	95
8.3.	Anexo 3	95
8.4.	Anexo 4	96
8.5.	Anexo 5	96
8.6.	Anexo 6	97
8.7.	Anexo 7	97
8.8.	Anexo 8	98
8.9.	Anexo 9	98
8.10.	Anexo 10.....	99
8.11.	Anexo 11.....	99
8.12.	Anexo 12.....	100
8.13.	Anexo 13.....	100
8.14.	Anexo 14.....	101
8.15.	Anexo 15.....	101
8.16.	Anexo 16.....	102
8.17.	Anexo 17.....	102
8.18.	Anexo 18.....	103
8.19.	Anexo 19.....	103
8.20.	Anexo 20.....	104
8.21.	Anexo 21.....	104

8.22.	Anexo 22.....	105
8.23.	Anexo 23.....	105
8.24.	Anexo 24.....	106
8.25.	Anexo 25.....	106
8.26.	Anexo 26.....	107
8.27.	Anexo 27.....	107
8.28.	Anexo 28.....	108
8.29.	Anexo 29.....	108
8.30.	Anexo 30.....	109
8.31.	Anexo 31.....	109
8.32.	Anexo 32.....	110
8.33.	Anexo 33.....	110
8.34.	Anexo 34.....	111
8.35.	Anexo 35.....	111
8.36.	Anexo 36.....	112
8.37.	Anexo 37.....	112
8.38.	Anexo 38.....	113
8.39.	Anexo 39.....	113
8.40.	Anexo 40.....	114
8.41.	Anexo 41.....	114
8.42.	Anexo 42.....	115

8.43.	Anexo 43.....	116
8.44.	Anexo 44.....	117
8.45.	Anexo 45.....	118
8.46.	Anexo 46.....	119
8.47.	Anexo 47.....	120
8.48.	Anexo 48.....	121
8.49.	Anexo 49.....	121
8.50.	Anexo 50.....	122
8.51.	Anexo 51.....	122
8.51.1.	Datos Hafnia alvei.....	122
8.51.1.1.	<i>Control positivo</i>	122
8.51.1.1.	<i>Experimentos</i>	123
8.51.2.	Datos Acinetobacter lwoffii.....	124
8.51.2.1.	<i>Control positivo</i>	124
8.51.2.2.	<i>Experimentos</i>	124
8.51.3.	Datos Pseudomona fluorescens.....	125
8.51.3.1.	<i>Control positivo</i>	125
8.51.3.2.	<i>Experimentos</i>	126
8.51.4.	Datos Pseudomona stutzeri.....	127
8.51.4.1.	<i>Control positivo</i>	127
8.51.4.2.	<i>Experimentos</i>	128

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1	14
Ecuación 2	14
Ecuación 3	14
Ecuación 4	14
Ecuación 5	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos de la Industria de curtiembre.....	6
Figura 2. Tabla de referencia de sustratos.....	94
Figura 3. Tabla de colores de sustratos para la identificación microbiana	103
Figura 4. Ejemplo Hoja Resultados	103

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de calibración McFarland	49
Gráfico 2. Valores residuales vs valores ajustados.....	50
Gráfico 3. Control negativo.....	59
Gráfico 4. Curva de crecimiento bacteriano <i>Hafnia alvei</i>	60
Gráfico 5. Curva de crecimiento bacteriano Control positivo <i>Hafnia alvei</i>	60
Gráfico 6. Curva de crecimiento bacteriano <i>Acinetobacter lwoffii</i>	62
Gráfico 7. Curva de crecimiento bacteriano Control positivo <i>Acinetobacter lwoffii</i> .	62
Gráfico 8. Curva de crecimiento bacteriano <i>Pseudomona fluorescens</i>	63
Gráfico 9. Curva de crecimiento control positivo <i>Pseudomona fluorescens</i>	64
Gráfico 10. Curva de crecimiento bacteriano <i>Pseudomona stutzeri</i>	65
Gráfico 11. Curva de crecimiento bacteriano Control positivo <i>Pseudomona stutzeri</i>	65
Gráfico 12. Curva de reducción de cromo en agua residual bacteria <i>Hafnia alvei</i>	67
Gráfico 13. Reducción Control positivo <i>Hafnia alvei</i>	67
Gráfico 14. Curva de reducción de cromo en agua residual <i>Acinetobacter lwoffii</i>	69
Gráfico 15. Reducción Control positivo <i>Acinetobacter lwoffii</i>	69
Gráfico 16. Curva de reducción de cromo en agua residual <i>Pseudomona fluorescens</i>	71
Gráfico 17. Reducción Control positivo <i>Pseudomona fluorescens</i>	71
Gráfico 18. Curva de reducción de cromo en agua residual bacteria <i>Pseudomona stutzeri</i>	73
Gráfico 19. Reducción Control positivo <i>Pseudomona stutzeri</i>	73
Gráfico 20. Distribución de los datos	78
Gráfico 21. Diagrama de caja y bigotes Bacterias vs Porcentaje de Reducción	80

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Ubicación curtiduría Serrano en ArcGIS	20
Ilustración 2. Instalaciones curtiduría Serrano	95
Ilustración 3. Equipos del proceso de curtido	95
Ilustración 4. Punto de toma de muestras.....	96
Ilustración 5. Preparación de viales para prueba DQO	96
Ilustración 6. Viales para la determinación de la DQO.	97
Ilustración 7. Digestión de la muestra.....	97
Ilustración 8. Diluciones	98
Ilustración 9. Desarrollo del color	98
Ilustración 10. Bioestimulación	99
Ilustración 11. Bioestimulación.....	99
Ilustración 12. Primera resiembra de microorganismos en Agar TSA	100
Ilustración 13. Cultivo madre	100
Ilustración 14. Primera dilución	101
Ilustración 15. Diluciones bacterianas	101
Ilustración 16. Cajas Petri	102
Ilustración 17. Conteo Bacteriano	102
Ilustración 18. Estándares McFarland.....	104
Ilustración 19. Primer muestreo.....	105
Ilustración 20. Muestreo y toma de parámetros in situ curtiduría Serrano	105
Ilustración 21. Resultados DBO 5 días	106
Ilustración 22. Sólidos Fijos	106
Ilustración 23. Conos Imhoff.....	107
Ilustración 24. Cajas Petri	107

Ilustración 25. Cajas Petri	108
Ilustración 26. Cajas Petri	108
Ilustración 27. OxiStrips	109
Ilustración 28. Prueba Oxidasa.....	109
Ilustración 29. Medio SIM	110
Ilustración 30. Interpretación Medio SIM.....	110
Ilustración 31. Kit Microgen GN ID A+B	111
Ilustración 32. GNA+B Oxidasa Negativa.....	111
Ilustración 33. GNA Oxidasa Positiva.	112
Ilustración 34. GNB Oxidasa Positiva	112
Ilustración 35. Resultado Identificación Bacteria 1	113
Ilustración 36. Resultado Identificación Bacteria 2.....	113
Ilustración 37. Resultado Identificación Bacteria 3.....	114
Ilustración 38. Resultado Identificación Bacteria 4.....	114
Ilustración 39. Resultado Identificación Bacteria 5.....	115
Ilustración 40. Identificación Bacteria 1	116
Ilustración 41. Identificación Bacteria 2	117
Ilustración 42. Identificación Bacteria 3	118
Ilustración 43. Identificación bacteria 4.....	119
Ilustración 44. Identificación bacteria 5	120
Ilustración 45. Control Positivo	121
Ilustración 46. Control positivo	121
Ilustración 47. Experimento	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros Físicos y Químicos del Agua.....	42
Tabla 2. Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5).....	43
Tabla 3. Cálculo de Sólidos Totales	44
Tabla 4. Cálculo de Sólidos Fijos Totales.....	45
Tabla 5. Cálculo de Sólidos Volátiles.....	45
Tabla 6. Cálculo de Humedad relativa de la muestra	46
Tabla 7. Identificación de cultivos aislados	47
Tabla 8. Conteo en placa de los cultivos aislados	48
Tabla 9. Prueba de Oxidasa.....	51
Tabla 10. Prueba agar SIM.....	51
Tabla 11. Identificación microbiana	52
Tabla 12. Cinética del crecimiento bacteriano <i>Hafnia alvei</i>	54
Tabla 13. Cinética del crecimiento bacteriano <i>Acinetobacter lwoffii</i>	55
Tabla 14. Cinética del crecimiento bacteriano <i>Pseudomona fluorescens</i>	56
Tabla 15. Cinética del crecimiento bacteriano <i>Pseudomona stutzeri</i>	57
Tabla 16. Control negativo.....	58
Tabla 17. Resumen Crecimiento	74
Tabla 18. Resumen Reducción Cromo (VI).....	76
Tabla 19. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk	77
Tabla 20. Análisis de Varianza (ANOVA)	78
Tabla 21. Prueba de Tukey.....	79
Tabla 22. Datos para curva de calibración McFarland	104
Tabla 23. Control positivo <i>Hafnia alvei</i>	122
Tabla 24. Reducción Bacteria <i>Hafnia alvei</i>	123

Tabla 25. Control positivo <i>Acinetobacter lwoffii</i>	124
Tabla 26. Reducción Bacteria <i>Acinetobacter lwoffii</i>	124
Tabla 27. Control positivo <i>Pseudomona fluorescens</i>	125
Tabla 28. Reducción Bacteria <i>Pseudomona fluorescens</i>	126
Tabla 29. Control positivo <i>Pseudomona stutzeri</i>	127
Tabla 30. Reducción Bacteria <i>Pseudomona stutzeri</i>	128

RESUMEN

Dentro de la presente investigación se caracterizó agua residual de curtido y se identificaron microorganismos a partir de varios aislamientos de agua y lodo residual para realizar una reducción del cromo hexavalente que se encuentra presente en el proceso de curtido de la Industria “Curtiduría Serrano” ubicada en la provincia de Tungurahua. Se realizó una bioestimulación a las aguas de curtido y a los lodos resultantes del tratamiento insitu, se aislaron microorganismos con características morfológicas diferentes.

La identificación de los microorganismos se efectuó a partir de pruebas bioquímicas Microgen GN ID A+B y pruebas complementarias como la prueba de oxidasa y prueba en medio SIM. Los tres microorganismos más eficientes se identificaron como *Pseudomona fluorescens* (60.61%), *Pseudomona stutzeri* (46.55%) y *Acinetobacter lwoffii* (46.35%). Se determinó las curvas de crecimiento bacteriano, donde se pudo observar que las bacterias que presentaron la mejor adaptación y tolerancia al medio contaminado a una concentración de 2500 ppm de cromo, fueron las que también demostraron una reducción significativa en el porcentaje de cromo de la muestra de agua residual de curtido.

Se evaluó el potencial de biotransformación que tienen los microorganismos resistentes que se encuentran en el sitio de la contaminación, específicamente en el agua y lodos residuales del proceso de curtido donde existen altas concentraciones de cromo y se recomienda para su futuro uso como una tecnología alternativa.

Palabras clave: resistencia bacteriana, metales pesados, reducción, identificación.

ABSTRACT

Within the present investigation, wastewater from tanning was characterized and microorganisms were identified from several isolations of water and residual sludge to make a reduction of the hexavalent chromium that is present in the tanning process of the "Curtiduría Serrano" Industry located in the province of Tungurahua. Biostimulation was performed on the tanning waters and the sludge resulting from the insitu treatment, microorganisms with different morphological characteristics were isolated.

The identification of the microorganisms was carried out from Microgen GN ID A+B biochemical tests and complementary tests such as the oxidase test and test in SIM medium. The three most efficient microorganisms were identified as *Pseudomonas fluorescens* (60.61%), *Pseudomona stutzeri* (46.55%) and *Acinetobacter lwoffii* (46.35%). The bacterial growth curves were determined, where it was observed that the three bacteria that best adapted to the concentration of 2500 ppm of chromium on average were *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomona stutzeri* and *Acinetobacter lwoffii*.

The biotransformation potential of the resistant microorganisms found at the site of contamination, specifically in the water and sewage sludge from the tanning process where high concentrations of chromium are present, was evaluated and is recommended for future use as an alternative technology.

Key words: bacterial resistance, heavy metals, reduction, identification.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el recurso agua se encuentra afectado por diferentes tipos de contaminación, entre ellas la polución por algún metal pesado, que de acuerdo con Londoño et. al. (2016), es un elemento químico con alta densidad, esto quiere decir que su peso molecular es superior a 4 g/cm^3 , además de ser tóxico a bajas concentraciones.

La contaminación por parte de las industrias, el desarrollo tecnológico y la explotación de los recursos ha provocado un uso indiscriminado de varios compuestos químicos especialmente metales pesados, que finalmente alteran la sostenibilidad de la cadena trófica, provocando riesgos en la naturaleza y al ser humano (Londoño et al., 2016).

La presencia de metales pesados en el ambiente pueden desencadenar intoxicaciones causando daños irreparables en la salud de los seres vivos, tan graves como efectos mutagénicos, cancerígenos e incluso la muerte (Londoño et al., 2016).

“Las actividades industriales generan una contaminación a gran escala con metales pesados (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Co, Ag, Au) y radionúclidos (U, Th) en el medio ambiente” (Vullo, 2003, p. 2).

En Ecuador, la industria de curtiembre es una de las más contaminantes en lo que se refiere al recurso hídrico. Esto debido al uso de sales de cromo en sus procesos de curtido, los cuales terminan dispuestos en las vertientes naturales de agua luego de culminado el proceso. La cantidad de curtidurías ha incrementado por la demanda de cuero existente para sus distintos usos, especialmente en el cantón Ambato, provincia Tungurahua, lugar donde se produce el mayor porcentaje de cuero del país (Masabanda, Echeagaray, Delgado, & Echeagaray, 2017).

El sulfato de cromo III es así uno de los tipos de sales de cromo utilizada en los procesos de curtiduría, debido a las características que brinda al producto final, del 60-80% de este compuesto reacciona con la piel y aproximadamente el 20-40% de cromo restante termina como residuo en el agua (Córdova et al., 2013). El cual a su vez por distintos factores ambientales se puede oxidar de Cr (III) a su forma más tóxica y móvil, que es el Cr (VI) (Nacheva, Armenta, Cardoso, & Camperos, 2005).

El cromo hexavalente es considerado un contaminante de prioridad 1 según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), estable en solución acuosa y presenta alta movilidad en diferentes ambientes (Vullo, 2003).

El pasaje a Cr (III) precipita el compuesto tóxico, disminuyendo así su peligrosidad en el ambiente, por lo que la utilización de microorganismos resistentes a este elemento químico con capacidad de biotransformación de Cr (VI) en Cr (III) es de fundamental importancia en el tratamiento biológico de efluentes industriales (Vullo, 2003).

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos, entre ellos se encuentran principalmente los que involucran: a) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad, b) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y c) transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Cervantes et al., 2006).

“Los mecanismos microbianos de interacción con cromato son de interés básico y de importancia biotecnológica, en el contexto del desarrollo de nuevas tecnologías

para la biorremediación de sitios contaminados con dicho ión” (Cervantes et al., 2006, p. 3).

La presente investigación se centra en el análisis de agua residual proveniente de la industria de curtiembre, específicamente el agua residual y lodos resultantes de la etapa de curtido. Se realiza análisis fisicoquímicos y aislamiento microbiológico para hallar bacterias resistentes al cromo y posteriormente efectuar una inoculación de estas en el agua, llegando así a determinar la reducción del metal pesado por parte de los microorganismos en el agua.

Se plantea la siguiente hipótesis para el experimento: Los microorganismos presentes en el agua residual y lodos residuales del proceso de curtido son resistentes a altas concentraciones de metales pesados y pueden insolubilizar el cromo presente en el agua residual de curtido.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo general

Insolubilizar biológicamente el cromo presente en aguas residuales de la industria de la curtiembre.

2.2.Objetivos específicos

- Caracterizar el agua residual proveniente de la industria de curtiembre.
- Determinar la concentración de cromo en aguas residuales de la industria de curtiembre.
- Identificar el o los microorganismos eficientes para la insolubilización del cromo presentes en el agua residual industrial de curtiembre.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Industria curtiembre

En concordancia a lo que establece Méndez (2007), las aguas residuales resultantes del proceso de curtiduría pueden presentar características muy diferentes dependiendo de la etapa del proceso. La alteración de sus propiedades puede generar contaminación física como ocurre en la contaminación térmica hasta contaminación por compuestos orgánicos e inorgánicos solubles o en suspensión (Méndez, 2007).

3.1.1. Curtido

“Se denomina curtido al proceso mediante el cual las pieles de los animales se transforman en un material denominado cuero” (Ministerio del Ambiente, 2013).

Existen 2 métodos para realizar el curtido de cuero: “uno en base de sales de cromo y otro a base de agentes vegetales, donde el 80 % de las industrias dedicadas a la actividad del curtido de pieles utiliza el proceso basado en las sales de cromo” (Ministerio del Ambiente, 2013).

Según el Ministerio del Ambiente del Ecuador, el proceso de curtiduría se encuentra conformado por doce etapas bien definidas, las cuales son: recepción de la materia prima, pretratamiento, curado y desinfectado, pelambre, descarnado, descamado, desengrasado, piquelado, curtido, secado, engrasado, planchado y clasificación (Ministerio del Ambiente, 2013).

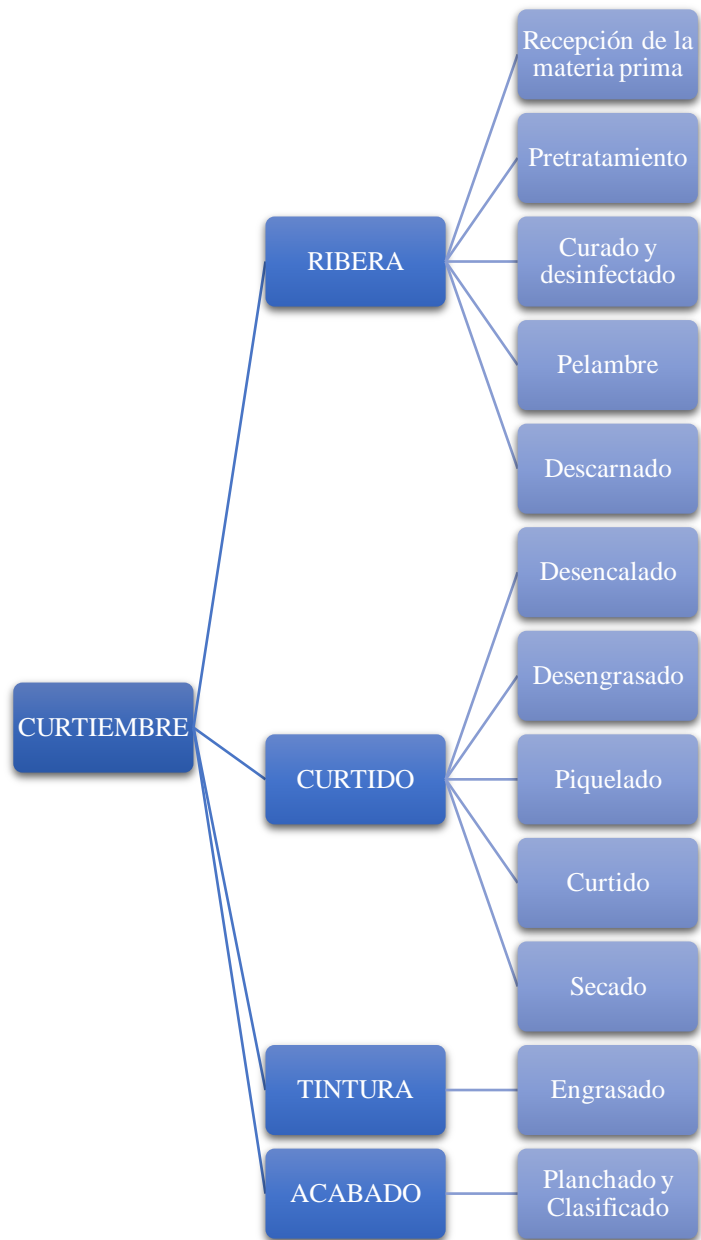


Figura 1. Procesos de la Industria de curtiembre

Fuente: (Ministerio del Ambiente, 2013).

Elaboración: Pardo S. & Pérez M., 2018.

De entre todas estas etapas la que despierta más interés por el gran consumo de productos químicos que emplea es la de curtido, debido a la utilización de sales de cromo, necesarias para transformar el colágeno de la piel, en cuero, un material

estable, impidiendo su degradación; sin embargo, esto afecta la calidad de los efluentes, cuerpos receptores, trabajadores de la planta e incluso habitantes aledaños a la zona (Rivela & Méndez, 2004).

3.1.1.1. Características de las aguas de curtido

Según Satalaya (2014) la etapa de curtido dentro de una curtiembre utiliza una proporción menor de agua que los procesos anteriores. La Comisión Nacional del Medio Ambiente (1999), menciona que las fases de desencalado, piquelado y curtición aportan con un 5% de DBO₅, 4% de DQO, 36% de Salinidad y un 24% de Toxicidad en relación al 100% de contaminación del efluente total del proceso.

La salinidad y toxicidad del efluente de curtido viene dada por la adición de sales de cromo, aproximadamente el 40% es utilizado para el producto terminado, de esto el 56% de cromo permanece en las aguas residuales salientes del proceso (Méndez, 2007).

Las concentraciones de cromo al final del proceso dependerán de la producción que tenga cada industria, sin embargo los valores referenciales varían entre 2000 mg/L para procesos tradicionales, es decir, procesos que no se haya aplicado alguna alternativa de reducción (Córdova & et.al., 2014).

3.1.2. Cromo

El cromo es un elemento que se encuentra en combinación con otros formando parte de la naturaleza en rocas, animales, plantas y en el suelo. “Las tres formas principales del cromo son: cromo (0), cromo (III) y cromo (VI)” (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2012).

3.1.3. Impactos del Cromo

Las únicas formas de importancia en toxicología son el cromo VI y el cromo III. El cromo (VI) es conocido porque causa varios efectos sobre la salud, posee dos características que explican el grado de toxicidad, de acuerdo con Molina, Aguilar, & Cordovez (2010), la primera característica es que las membranas celulares son permeables al cromo VI pero no al cromo III y la segunda característica el cromo VI se reduce a cromo III en el interior de las células, tanto de las mitocondrias como en el núcleo. “La ingesta de sales de cromo (VI) puede ocasionar lesiones graves o, incluso, la muerte” (Molina et al., 2010, p. 7).

El cromo puede encontrarse en bajas cantidades en vertientes naturales, sin embargo, su presencia, en estados de oxidación III y VI, puede aumentar como consecuencia de aportes antropogénicos (Morocho, 2017). “Por tal razón, aun cuando se libere Cr III al ambiente, no se puede asegurar que este permanezca en el estado químico en el que se lo liberó” (Morocho, 2017). Por ejemplo, la condición ácida que se genera en base a la deposición de residuos con cromo trivalente que se mezcla con otros residuos industriales, logran transformar el Cr III en Cr VI (Matteoda, Blarasin, Damilano, Cabrera, & Albo, 2009).

3.1.3.1. Legislación ambiental aplicable al cromo

Dentro de la normativa actual y vigente dentro del territorio ecuatoriano, existe el límite máximo permisible de descarga del cromo hexavalente y es nombrado en el Acuerdo Ministerial 0.97a, Tabla 8. Límites de descarga al Sistema de Alcantarillado Público, en donde nos ratifican que para este parámetro el máximo valor es de 0.5 mg/L.

3.1.4. Tratamiento al Agua Residual

Los problemas asociados al cromo hexavalente, según ratifica Metcalf & Eddy (1996), es que es carcinógeno y corrosivo para los tejidos, nos menciona que a largo plazo causa daños en los riñones y causa sensibilidad en la piel (Metcalf & Eddy, 1996).

De acuerdo con lo que recalca Suárez & Agudelo (2014), la industria de la curtiembre no solo afecta el recurso hídrico, sino también genera problemas en las redes de acueducto, alcantarillado y plantas de tratamiento de aguas residuales debido a incrustaciones y las grandes deposiciones de sólidos en las tuberías.

Cortón & Viale (2006), hacen referencia a los sistemas de depuración basados en lagunas de lodos activados, los cuales provocan disminución en la carga orgánica mediante la degradación por el uso de microorganismos.

3.1.4.1. Tipos de tratamiento

Existen diferentes tipos de tratamiento en la actualidad, estos se clasifican en:

3.1.4.1.1. Tratamiento primario

Tal como lo menciona Lombeida (2017), la mayor parte de las sustancias en suspensión y disolución en las aguas residuales no pueden retenerse en rejillas y desarenadores, ni tampoco pueden separarse mediante flotación por ser más pesadas que el agua. Por ello, se recurre a la sedimentación la cual consiste en precipitar un sólido de su masa líquida con la ayuda de la gravedad (Lombeida, 2017). Este tratamiento es conocido también como clarificación del agua, según menciona Martínez (2007, p. 17), “la meta de este proceso es retirar turbidez, partículas sólidas y materiales flotantes”.

3.1.4.1.2. *Tratamiento secundario*

También conocido como tratamiento biológico del agua, en donde es necesario lograr un balance entre el nivel de desperdicios orgánicos, el oxígeno disuelto y los niveles bacterianos (Martínez, 2007).

3.1.4.1.3. *Tratamiento terciario*

En este tratamiento se realizan procesos físico químicos al agua tales como precipitación, filtración o cloración con el fin de retirar exceso de nutrientes inorgánicos, como fosfatos y nitratos del efluente final (Martínez, 2007).

3.2. Biorremediación

“El término biorremediación se aplica a cualquier sistema o proceso en el que se empleen métodos biológicos para transformar contaminantes en el suelo o en las aguas” (Suárez, 2013).

Entre los metales pesados más comunes se encuentran el plomo, el cromo y el cadmio. Estos elementos son potencialmente cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos, además de presentar en ciertas dosis fenómenos asociados a toxicidad aguda (Brutti, Beltrán, & Garcia de Salomone, 2018).

De acuerdo con Arroyo & Rogel (2012, p. 2)., “el fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que, en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, se van a producir una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía”. Un sustrato orgánico exógeno se comporta como dador de electrones en la cadena respiratoria, de este modo la actividad metabólica de la célula actúa sobre el compuesto reduciéndolo (Arroyo & Rogel, 2012).

3.2.1. Biorremediación con Bacterias

El objetivo de la biorremediación es disminuir la concentración excedente de compuestos xenobióticos presentes en la naturaleza, utilizando como parte fundamental a los microorganismos (Cortón & Viale, 2006).

3.2.1.1. Insolubilización biológica del cromo

Para poder determinar un microorganismo o consorcio de microorganismos que sean capaces de remover el cromo del agua residual es necesario realizar una serie de pasos que se presentan a continuación:

3.2.1.1.1. Bioprospección

La bioprospección ha recibido varias definiciones sin embargo se la puede definir como “todos aquellos estudios que tienen como finalidad la búsqueda de microorganismos biotecnológicamente útiles” (Bonilla, 2013, p. 3).

Para la identificación bacteriana fenotípica se debe tener en cuenta las características visibles de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas (Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011).

Las características microscópicas de las bacterias seguido de la tinción Gram permite conocer la forma, agrupación, estructura celular y tamaño aproximado de los microorganismos analizados (Fernández et al., 2011).

3.2.2. Ventajas de la biorremediación con bacterias

Mientras que los tratamientos físicos y químicos están basados en transferir la contaminación entre estados de la materia, según lo asevera Suárez (2013), en la biorremediación se la lleva de un medio a otro; además nos menciona que en este tratamiento no se requiere la adición de compuestos que signifiquen una amenaza

para el medio. “Comparativamente, es económica viable y al tratarse de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de la opinión pública” (Suárez, 2013).

3.3.Cinética Bacteriana

Se entiende como crecimiento bacteriano al aumento en peso o del número de células de una población en un tiempo determinado. Para comprender de mejor manera se analiza la dinámica de crecimiento de una célula individual (Madigan et al., 2015).

3.3.1. Curva de crecimiento bacteriano

Un cultivo bacteriano en su crecimiento va a obedecer a cuatro etapas definidas: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Dos Santos, 2007).

3.3.1.1. Fase de Latencia

Corresponde al periodo en el cual se introducen los microorganismos en un medio de cultivo fresco, en esta etapa no existe un incremento inmediato del número de células, debido a la síntesis de los componentes que están realizando los organismos (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2013). Este periodo de tiempo en el crecimiento bacteriano variará dependiendo de los antecedentes del inóculo, la naturaleza del medio y las condiciones de crecimiento (Madigan et al., 2015).

3.3.1.2. Fase Exponencial

Según Willey et al. (2013), durante esta fase las células crecen y se dividen hasta el máximo nivel posible, su velocidad de crecimiento es constante es decir se duplican en intervalos regulares de tiempo; por lo que la población microbiana es uniforme en propiedades químicas y fisiológicas, propicio para estudios bioquímicos y fisiológicos.

3.3.1.3. Fase Estacionaria

Corresponde al periodo en el que los microorganismos dejan el crecimiento exponencial por lo cual la curva se torna horizontal, esto puede deberse a varios factores como la limitación de nutrientes o la acumulación de productos tóxicos del metabolismo (Willey et al., 2013).

3.3.1.4. Fase de Muerte

Según menciona Madigan et al. (2015), el ciclo de crecimiento en esta etapa sigue también una función exponencial no obstante, esta es menos pronunciada que en la fase de crecimiento exponencial, además alude que en un cultivo puede haber células viables durante meses o incluso años.

Willey et al. (2013), describe que este fenómeno en que las células son denominadas viables, pero no cultivables, se debe a la genética resultante de las células debilitadas de la fase anterior.

3.3.2. Matemáticas de crecimiento

La velocidad de crecimiento microbiano en la fase exponencial se da cuando el número de células se duplica a intervalos constantes de tiempo o también denominado tiempo de generación. Estas observaciones pueden expresarse como ecuaciones según Willey et al. (2013):

Sea N_0 = número inicial de células (población inicial)

N_t = población en el tiempo t

n = número de generaciones en el tiempo t

La relación fija existente entre el número de células inicial y el número tras un período de crecimiento exponencial se puede expresar como

Ecuación 1

$$N_t = N_0 \times 2^n$$

Despejando n

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N_t - \log N_0}{0.301}$$

La velocidad de crecimiento bacteriano puede ser expresada en términos de la constante de velocidad media de crecimiento (k)

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

El tiempo de generación (g), si la población se duplica ($t = g$) será:

$$N_t = 2N_0.$$

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

Ecuación 2

$$k = \frac{1}{g}$$

Siendo así el tiempo de generación inverso a la constante de velocidad media de crecimiento.

Ecuación 3

$$g = \frac{1}{k}$$

Ecuación 4

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

Al realizar una gráfica semilogarítmica de crecimiento a partir de los datos de crecimiento, se podrá calcular también el tiempo de generación (g) y posteriormente la constante de velocidad de crecimiento (Willey et al., 2013).

3.4.Métodos

3.4.1. Medios de Cultivo

De una forma muy general, de acuerdo con lo estipulado por Barrero (2016), se puede decir que los medios de cultivo se componen de: una fuente de carbono, nitrógeno, amortiguadores del valor de pH y otros componentes como sodio, potasio y vitaminas (Barrero, 2016).

3.4.1.1. Tipos de Medios de Cultivo

Los medios de cultivo según Barrero (2016), son de tres tipos:

- Líquidos (caldos). Son aquellos que no contiene ningún agente gelificante, siendo el crecimiento más rápido puesto que la movilidad ayuda a que los microorganismos alcancen de una forma más fácil los nutrientes (Barrero, 2016). Para la investigación descrita en el presente documento, se utilizó caldo de triptona y soja (TSB), que de acuerdo con Rodr (1981), “es el medio de elección para los ensayos de sensibilidad por diluciones sucesivas por su gran capacidad de soportar el crecimiento de casi todos los organismos” (p. 266).
- Sólidos. “Tienen una proporción de agar de aproximadamente el 1.5%” (Barrero, 2016). En la presente investigación se utilizó el Agar de Soja Tríplico (TSA) y de acuerdo con Rodr (1981) “el cual contiene peptona de soja y peptona de caseína en proporciones comprobadas para soportar el

crecimiento de una variedad de microorganismos incluso algunos de los más exigentes” (p. 264).

- Semisólidos. Contienen una proporción de agar inferior al 0.5%, se utilizan para pruebas bioquímicas y de movilidad (Barrero, 2016).

3.4.2. Pruebas Bioquímicas

Existen diferentes pruebas bioquímicas dirigidas a la identificación microbiana, tal como menciona Fernández et al. (2011), una de las más importantes es la prueba de la oxidasa la cual es utilizada para determinar si un microorganismo produce la enzima citocromooxidasa. De manera adicional ratifica lo siguiente y cito: “La prueba se usa en la caracterización inicial de bacterias Gram negativas” (Fernández et al., 2011, p. 33).

La prueba oxidasa requiere la presencia de oxígeno, la reacción se efectúa mediante la enzima citocromooxidasa que se encuentra en el interior de la célula, esta oxida el reactivo fenilendiamina y forma un compuesto color púrpura llamado indofenol (Fernández et al., 2011, p. 33).

En relación a las pruebas bioquímicas expandidas en forma comercial, Fernández et al. (2011), nos menciona que estas pruebas de igual manera ayudan a determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación, estas pruebas evalúan la presencia de una enzima y su reacción varía entre unos segundos hasta unas horas (p. 8).

3.4.3. Kit Microgen GN ID A+B

De acuerdo con Microgen Bioproducts (2007), este sistema Microgen GN-ID contiene dos tiras de micropocillos denominadas GN A y GN B. Cada tira contiene 12 substratos bioquímicos estandarizados, los cuales son necesarios para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* y microorganismos tipo Gram

negativos no exigentes sean estos oxidasa positivos o negativos (Microgen Bioproducts, 2007).

Se presenta en el Anexo 1 la tabla de referencia de los sustratos y la descripción de las reacciones que presenta el kit Microgen GN ID A+B.

3.4.4. Nefelometría

La turbidez se define por la Organización Internacional de Normalización (ISO), como “la reducción de la transparencia de un líquido causada por la presencia de partículas no disueltas de material distinto al propio líquido y se mide utilizando las técnicas de turbidimetría o nefelometría” (Acebo-González & Hernández-García, 2013).

Por ello la turbidimetría resulta un método práctico, según lo dicho por Tortora, Funke & Case (2007, p. 182) para controlar el crecimiento microbiano: “Cuando las bacterias se multiplican en un medio líquido este se torna turbio o nebuloso por las células”. “Las bacterias bloquean y reflejan la luz que pasa a través del medio, siendo la luz absorbida directamente proporcional a la concentración de células presentes en el cultivo” (Acebo-González & Hernández-García, 2013, p. 5).

3.4.5. Índice de McFarland

De acuerdo con Fiallos (2017), las técnicas turbidimétricas sirven también para estimar el crecimiento celular en procesos biológicos, donde el índice de McFarland a través de estándares de cloruro de bario y ácido sulfúrico producen partículas suspendidas de sulfato de bario, donde se compara la turbidez de estas a diferentes concentraciones con el medio analizado indicando el crecimiento celular.

3.4.6. Control experimental

De acuerdo a lo que estipula la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y Delitos, los controles sirven para determinar la validez del ensayo a lo largo del tiempo, además mencionan que los controles en lo posible deberán prepararse con las mismas características de las muestras (Las Naciones Unidas Contra La Droga Y El Delito, 2012).

Según lo aseveran Johnson & Besselsen (2018, p. 3), existen dos tipos de controles: “en los grupos de control positivo, se esperan cambios. El control positivo actúa como un estándar contra el cual medir”. Además mencionan que “se espera que los controles negativos no produzcan ningún cambio desde el estado normal” (Johnson & Besselsen, 2018, p. 3).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.Descripción del área de estudio

4.1.1. Curtiduría Serrano

La curtiduría Serrano se encuentra en la provincia de Tungurahua, cantón Ambato, parroquia Atahualpa se encuentra ubicada en la calle Alberto Rosero y Maximiliano Rodríguez, sector San Vicente. En sus instalaciones se dedican a la curtiembre de pieles de ganado ya más de 25 años (Véase Anexo 2).

4.1.2. Localización

Los siguientes puntos fueron tomados en la visita in situ a la curtiduría Serrano con el equipo GPS en coordenadas UTM tomando como referencia el elipsoide WGS-84:

Punto 1: 767282,296 E; 9864608,027 N; Zona 17 S

Punto 2: 767270,488 E; 9864690,904 N; Zona 17 S

Punto 3: 767252,298 E; 9864685,943 N; Zona 17 S

Punto 4: 767304,884 E; 9864617,813 N; Zona 17 S

Punto 5: 767267,807 E; 9864678,841 N; Zona 17 S

Los cuatro primeros puntos corresponden a las esquinas de la industria, mientras que el último punto fue tomado en el punto de muestreo agua residual. A continuación, se presenta la georreferenciación de la curtiduría Serrano realizado en el programa ArcGIS versión 10.4.1.

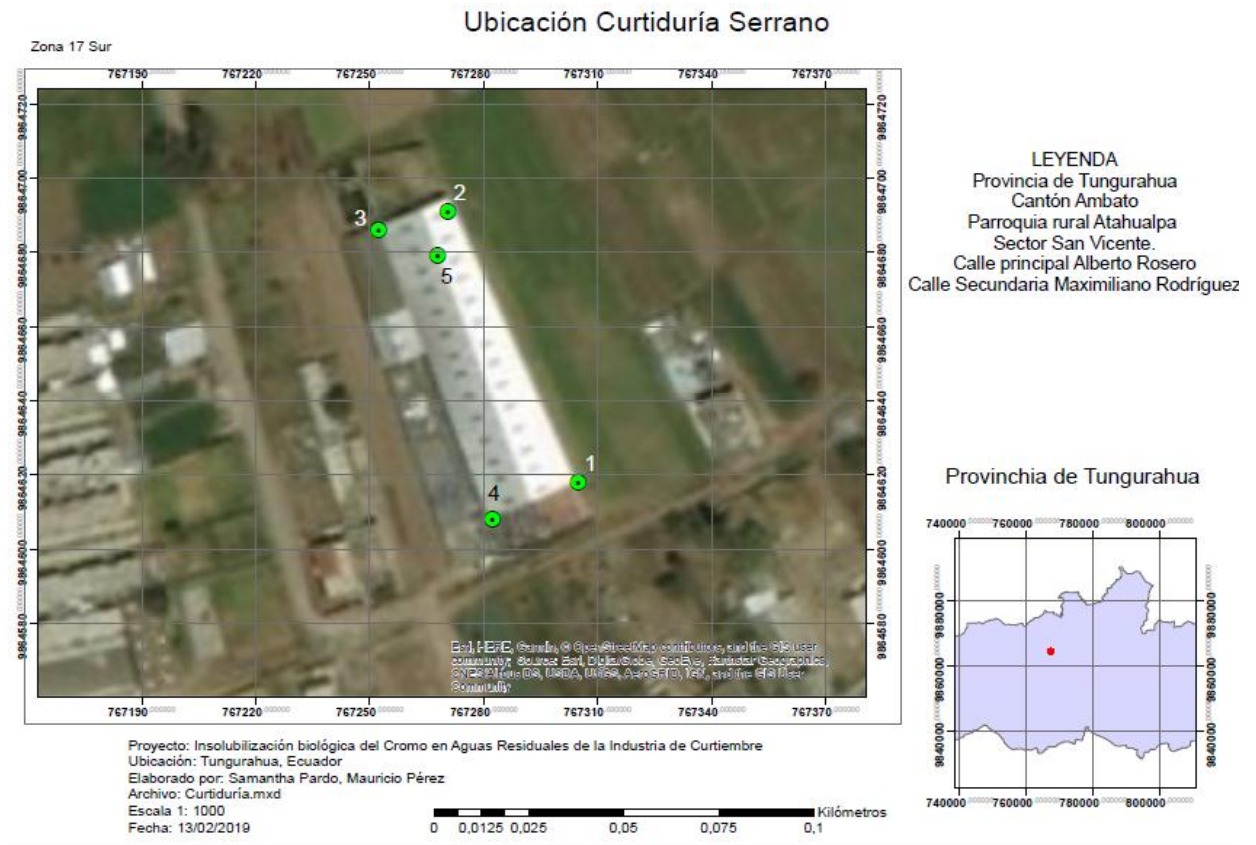


Ilustración 1. Ubicación curtiduría Serrano en ArcGIS

4.2. Muestreo

Para la toma de muestras de agua residual de agua de curtido (Véase Anexo 3) y lodos residuales se utilizaron los siguientes implementos: papel aluminio, etiquetas, marcador, botellas ámbar estériles de 250 mL y de un litro, hielera, frascos estériles de plástico de 100 mL.

El punto de toma de agua residual está ubicado antes de la descarga al sistema de pretratamiento de la curtiduría (Véase Anexo 4). El punto de toma de lodos residuales líquidos es en el tanque de tratamiento y los lodos sólidos se los tomó del lecho de secado, considerado la etapa final del tratamiento.

El muestreo se realizó tomando y vaciando 3 veces el agua residual en cada botella y además las mismas fueron etiquetadas con los siguientes datos: Tipo de

muestra, Hora, Fecha, Lugar, Proyecto y Apellidos de los investigadores. Las muestras fueron dispuestas en un cooler hasta su posterior refrigeración en instalaciones de la Universidad Politécnica Salesiana.

4.3. Caracterización bioquímica del agua

El agua proveniente del efluente del curtido de pieles se caracterizó según los parámetros descritos a continuación:

4.3.1. Sólidos totales, volátiles y fijos

Se realizó bajo el procedimiento descrito según APHA (2005) mediante el uso de 3 crisoles de 100mL previamente etiquetados.

4.3.1.1. Preparación de Crisoles

- Lavar los crisoles con agua destilada.
- Colocar los crisoles en la estufa a una temperatura de 105°C por 1 hora.
- Traspasar los crisoles en el desecador por 15 minutos.
- Insertar los crisoles en la mufla a una temperatura de 550°C por 20 minutos.
- Colocar los crisoles en el desecador por 15 minutos.
- Pesar los crisoles en tríplica, empleando la balanza analítica.
- Repetir el procedimiento hasta obtener un valor constante o una variación de hasta el 4% del peso previo.

4.3.1.2. Procesamiento de la Muestra

- Agitar la muestra para homogenizar la solución.
- Medir 100mL de muestra de agua residual en una probeta.
- Trasvasar el agua en los crisoles previamente tarados.
- Insertar los crisoles en la estufa a una temperatura de 105°C durante 12 horas.
- Ubicar los crisoles en el desecador por 15 minutos.

- Pesar los crisoles tres veces mediante la balanza analítica.
- Repetir el procedimiento hasta obtener un valor constante o una variación de hasta el 4% del peso previo.

4.3.1.3. *Determinación de sólidos fijos*

- Colocar los crisoles en la mufla a una temperatura de 550°C durante 1 hora, para calcinar la muestra.
- Traspasar los crisoles al desecador para su enfriamiento.
- Pesar los crisoles tres veces en balanza analítica.
- Repetir el procedimiento hasta obtener un valor constante o una variación de hasta el 4% del peso previo.

Fórmulas utilizadas para calcular la cantidad de sólidos en las muestras de agua, según APHA (2005):

$$\%Sólidos\ Totales = \frac{(A - B) * 100}{(C - B)}$$

$$\%Sólidos\ Volátiles = \frac{(A - D) * 100}{(A - B)}$$

$$\%Sólidos\ Fijos = \frac{(D - B) * 100}{(A - B)}$$

$A = \text{Peso del residuo seco} + \text{crisol (mg)}$

$B = \text{Peso del crisol (mg)}$

$C = \text{Peso mojado} + \text{crisol (mg)}$

$D = \text{Peso del residuo calcinado} + \text{crisol (mg)}$

$$\text{mg Sólidos Volátiles/ L} = \frac{(A - B) * 1000}{\text{Volumen de la muestra en mL}}$$

$$mg \text{ Sólidos Fijos} / L = \frac{(B - C) * 1000}{Volumen \text{ de la muestra en mL}}$$

$A = \text{Peso del residuo seco} + \text{crisol (mg)}$

$B = \text{Peso del residuo calcinado} + \text{crisol (mg)}$

$C = \text{Peso del crisol (mg)}$

(APHA, 2005).

4.3.2. pH, Conductividad y Oxígeno Disuelto

En el primer muestreo los datos de pH fueron tomados in situ a través de tiras para prueba de pH marca Macherey-Nagel pH-Fix 0-14PT y ex situ se determinaron todos los parámetros mediante el equipo LAQUAact modelo D74, de la siguiente manera:

- Agitar la muestra para homogenizarla.
- Medir 300 mL de muestra en un vaso de precipitación de 400mL.
- Colocar el electrodo correspondiente dentro del vaso de precipitación.
- Anotar las mediciones en tríplica.

Para el segundo muestreo se tomaron los datos de pH, conductividad y oxígeno disuelto con la ayuda de los equipos respectivos que fueron llevados a la curtiduría Serrano.

4.3.3. Demanda Química de Oxígeno (DQO)

- Se preparó el Digestor marca SCP Science DigiPREP CUBE, ajustándolo a 150 °C y programando 120 minutos en el temporizador del mismo (Véase Anexo 5).

- Se requirió de cuatro viales para el análisis de DQO (marca COD/CSB) de rango 0 – 1500 mg/L, siendo que uno servirá para el blanco, uno para el agua residual pura, uno para la dilución del agua residual en relación 1:10 y el último para la dilución del agua en relación 1:100 (Véase Anexo 6).
- Se trajo las muestras de agua residual a temperatura ambiente y se realizó las diluciones respectivas de 1:10 y 1:100.
- Se inoculó 2 mL de agua destilada en el vial correspondiente al blanco, agitándolo moderadamente.
- Para los tres viales restantes se tomó 2 mL de agua residual pura y 2 mL de cada una de las diluciones preparadas, asimismo se agitó y se colocó todos los viales en el digestor por 2 horas.
- Se llevó los viales a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de los mismos en un espectrofotómetro marca Jasco modelo V-630.

4.3.4. Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅)

- Se trajo las muestras de agua residual a temperatura ambiente
- En 4 botellas ámbar de 500 mL se adicionó 1 agitador magnético y 1 g de Hidróxido de Sodio (NaOH) de Merck.
- Se preparó una botella con 250 mL agua destilada, la cual sirvió de blanco.
- Se vertió y etiquetó cada una de las botellas con 90 mL, 250 mL y 400 mL de agua residual respectivamente y se esperó 30 minutos.
- Se tapó cada una de las botellas con el equipo Velp Scientifica para determinación manométrica de la D.B.O., programando cada uno para el rango establecido.

- Se colocaron las botellas dentro de la incubadora marca Memmert SNB-400 a 20 °C por 5 días.
- Después de transcurrido ese tiempo se anota el resultado marcado en la tapa de cada botella que corresponde a la DBO₅.

4.3.5. Determinación color del agua

Se realizó con la ayuda del Fotómetro Hanna Instruments HI-83200, siguiendo el procedimiento descrito en el manual del equipo y se detalla a continuación:

- Para seleccionar el método deseado pulsar METHOD
- Se seleccionó el método Color del Agua
- Se llenó una cubeta hasta la marca con agua desionizada, siendo este el blanco.
- Se puso el blanco (#1) en la célula de medición
- Se pulsó la tecla ZERO y se retiró el blanco una vez tomada la medición.
- Se llenó la segunda cubeta hasta la marca con muestra sin filtrar. Este es el color aparente.
- Se filtró 10 mL de muestra a través de un filtro con membrana de 0.45 µm. Este es el color verdadero.
- Se insertó la cubeta de color aparente (#2) en el instrumento y se tomó la medición en PCU.
- Se insertó la cubeta de color verdadero (# 3) y se tomó la medición en PCU (Hanna Instruments, 2019).

4.4.Determinación de cromo en el agua residual

De acuerdo con APHA (2005), una de los procedimientos principales para determinar la concentración de cromo en una muestra de agua es el Método Colorimétrico, el cual para este caso se deberá transformar el cromo trivalente en cromo hexavalente mediante digestión de la muestra.

El procedimiento detallado se encuentra en los siguientes literales y fue realizado en referencia a lo citado por APHA (2005):

4.4.1. Preparación de soluciones

1. Solución de dicromato de potasio: Se pesó 141.4 mg de dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ de Loba Chemie en la balanza analítica marca Metler Toledo modelo MS204S y se aforó a 100 mL de agua destilada. Se procedió a guardar la solución en una botella ámbar.
2. Solución patrón de dicromato de potasio 5 $\mu\text{g/L}$: Se tomó 0.1 mL de la solución anterior de dicromato de potasio marca Loba Chemie y se aforó a 10 mL.
3. Se preparó soluciones estándar en base a la solución Patrón de dicromato de potasio, las cuales fueron utilizadas para la determinación de la curva de calibración en el espectrofotómetro marca Jasco modelo V-630, con las siguientes concentraciones: 0.01 $\mu\text{g/L}$, 0.05 $\mu\text{g/L}$, 0.1 $\mu\text{g/L}$, 0.15 $\mu\text{g/L}$, 0.2 $\mu\text{g/L}$.
4. Solución de ácido sulfúrico: Se midió 2.7 mL de H_2SO_4 95 – 97 % de Merck en la balanza analítica marca Metler Toledo modelo MS204S se aforó a 500 mL de agua destilada para obtener una solución de concentración 0.2 N. Se procedió a guardar la solución en una botella ámbar.

5. Solución de ácido sulfúrico: Se midió 2.7 mL de H_2SO_4 95 – 97 % de Merck en la balanza analítica marca Metler Toledo modelo MS204S se aforó a 500 mL de agua destilada para obtener una solución de concentración 1 N. Se procedió a guardar la solución en una botella ámbar.
6. Solución de naranja de metilo.
7. Solución de permanganato de potasio: Se pesó 400 mg de permanganato de potasio KMnO_4 y se aforó con 10 mL de agua destilada.
8. Solución de 1,5 difenilcarbazida: Se pesó 100 mg de 1,5 difenilcarbazida $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$ de Merck en la balanza analítica marca Metler Toledo modelo MS204S y se diluyó en 20 mL de acetona $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$, y se almacenó en una botella ámbar.

4.4.2. Curva de calibración de cromo hexavalente

Para obtener esta curva se utilizó el equipo espectrofotómetro marca Jasco modelo V-630, y se ocupó el programa Spectra Manager.

4.4.3. Barrido espectrofotométrico

Se realizó el procedimiento en base a lo que menciona APHA (2005), se determinó en un rango de 530 a 540 nm siguiendo los siguientes pasos:

- a. Encender el equipo espectrofotómetro marca Jasco modelo V-630
- b. Abrir el programa Spectra Manager
- c. Dar clic a la opción Spectra Measurement
- d. Llenar una de las celdas de cuarzo con la solución estándar de menor concentración, en este caso de 0.1 $\mu\text{g/L}$, colocarla en el portaceldas y cerrar el equipo.
- e. Dar clic en Measure

- f. Clic en Parameters, escoger en Photometric Mode la opción Abs (Absorbancia).
- g. En el parámetro de Start colocar 530 nm.
- h. En el parámetro de End colocar 540 nm y dar Aceptar.
- i. Dar click en Sample Measurement, click en Measure
- j. Guardar la gráfica resultante.

4.4.4. Curva de calibración

Se determinó a 530 nm según el barrido espectrofotométrico

- a. Encender el equipo espectrofotómetro marca Jasco modelo V-630
- b. Abrir el programa Spectra Manager
- c. Dar clic a la opción Quantitative Calibration
- d. Clic en File, opción New
- e. En el submenú Parameters, en la opción Peak poner 530 nm, así como en la opción Response colocar Medium.
- f. Colocar en el submenú Calibration Graph, en la opción de unidades colocar ppm (mg/L), dar clic en OK.
- g. En la tabla inferior, en la columna Sample escribir un nombre para cada estándar, mientras en la columna que nos pide la Concentración colocamos los valores de las soluciones estándar preparadas.
- h. Para el blanco colocar agua destilada en una de las celdas, colocarla en el equipo y cerrar el equipo. Señalar y marcar la opción Blank de la tabla inferior, posteriormente dar clic en Baseline Measurement.
- i. Para los estándares llenar otra de las celdas con la solución de dicromato de potasio estándar de 0.1 ppm, colocarla en el equipo y

cerrarlo. Señalar y marcar la casilla 1 de la tabla inferior, posteriormente dar clic en Sample Measurement. Realizar este procedimiento para todas las soluciones estándar.

- j. Guardar la curva resultante.

4.4.5. Digestión y Tratamiento de la muestra

- a. Dentro de la sorbona se tomó 10 mL de la muestra a analizar, se adicionó 4 mL de ácido nítrico HNO_3 y se colocó en una plancha de calentamiento hasta su ebullición.
- b. Se esperó entre 10 – 20 minutos hasta que la muestra redujera su volumen a menos de la mitad y se dejó reposar por 5 minutos para su enfriamiento (Véase Anexo 7).
- c. Se filtró la muestra mediante un filtro jeringa marca Wattman de material PVDF de 0.45 μm .
- d. Se hizo una dilución 1 a 100 de cada una de las muestras (Véase Anexo 8).
- e. Con la ayuda de una probeta se midió 10 mL de esta dilución y se transfirió a un vaso de precipitación de 25 mL.
- f. Se añadió 70 μL de la solución de naranja de metilo para obtener un color rojizo.
- g. Se agregó 80 μL de hidróxido de amonio NH_4OH obteniendo una coloración amarilla de la muestra.
- h. Se sumó 35 μL de la solución de ácido sulfúrico H_2SO_4 1N para conseguir un color rosáceo de la muestra.
- i. Se colocó la muestra en una plancha de calentamiento hasta su ebullición.

- j. Se incorporó 10 μL de la solución de permanganato de potasio KMnO_4 dejándola en ebullición por dos minutos y se enfrió por 3 minutos.
- k. Se agregó 55 μL de la solución de 1,5 difenilcarbazida y se agitó por 9 minutos en una agitadora orbital marca N-BIOTEK modelo NB-101M (Véase Anexo 9).
- l. Se transfirió la muestra tratada en una celda de vidrio para espectrofotómetro UV visible y se midió la concentración de Cr (VI) en el programa Spectra Manager.

4.5. Bioestimulación

4.5.1. Preparación de Medios

4.5.1.1. Caldo TSB

- Se pesó 7,5012 mg de Bacto Caldo de soja tréptica Medio digerido de soja caseína (TSB) en la balanza analítica marca Metler Toledo modelo MS204S.
- Pesar 25,6 mg de sulfato de hierro II y amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de Loba Chemie en la balanza analítica marca Metler Toledo modelo MS204S, esta es la sal de Mohr.
- En un matraz erlenmeyer de 250 mL se suspendió las dos sustancias previamente pesadas y se aforó con agua destilada.
- Se calentó y agitó el caldo hasta su ebullición por un minuto en una plancha magnética de calentamiento marca Velp Scientifica modelo FL5010100.
- Para su esterilización se taponó el matraz con algodón envuelto en gasa y se lo colocó en el equipo autoclave marca N-BIOTEK modelo NB-1080 por 3 horas.

- En área estéril se dispensó 50 mL del caldo en tres matraces erlenmeyer de 125 mL.
- Adicionalmente se colocó en cada uno de los matraces 50 mL de lodo residual proveniente de la fase de curtido de la industria de cuero (Véase Anexo 10).
- Se homogenizó la muestra y se la dispuso en una campana de extracción marca ISOCIDE modelo ESCO 5152.
- Se incubó a temperatura ambiente durante 7 días con agitación de 2 minutos cada 48 horas (Véase Anexo 11).

4.5.1.2. Agar Cetrimida

- Se pesó 6.7951 g de Base de Agar Cetrimida (para el aislamiento y cultivo de Pseudomonas) en la balanza analítica marca Metler Toledo modelo MS204S.
- Se ubicó el polvo pesado en un matraz erlenmeyer de 250 mL y se aforó con agua destilada a 150 mL.
- Se calentó y agitó el caldo hasta su ebullición por un minuto en una plancha magnética de calentamiento marca Velp Scientifica modelo FL0510100.
- Para su esterilización se taponó el matraz con algodón envuelto en gasa y se lo colocó en el equipo autoclave marca N-BIOTEK modelo NB-1080 por 3 horas.

4.5.1.2.1. Siembra en Agar Cetrimida

- En un área estéril se inoculó 1 mL de los caldos preparados hace 7 días, en cada una de las cajas Petri esterilizadas con anterioridad.
- Se dispensó equitativamente el Agar Cetrimida preparada en 4 cajas Petri.

- Se dejaron reposar hasta su gelificación en una campana de extracción marca ISOCIDE modelo ESCO 5152.
- Se incubó una semana a 37^a C en una incubadora marca ESCO modelo IFA-110-8.

4.5.1.3. Agar TSA

- Se pesó 6.0015 g de Agar de soja Trypticase Agar digerido de soja-caseína (TSA) en la balanza analítica marca Metler Toledo modelo MS204S.
- Se situó el polvo pesado en un matraz erlenmeyer de 250 mL y se aforó con agua destilada a 150 mL.
- Se calentó y agitó el caldo hasta su ebullición por un minuto en una plancha magnética de calentamiento marca Velp Scientifica modelo FL0510100.
- Para su esterilización se taponó el matraz con algodón envuelto en gasa y se lo colocó en el equipo autoclave marca N-BIOTEK modelo NB-1080 por 3 horas.

4.5.1.3.1. Siembra en Agar TSA

- En un área estéril se inoculó 1 mL de los caldos preparados hace 7 días, en cada una de las cajas Petri esterilizadas con anterioridad.
- Se dispensó equitativamente el Agar TSA preparada en 4 cajas Petri.
- Se dejaron reposar hasta su gelificación en una campana de extracción marca ISOCIDE modelo ESCO 5152.
- Se incubó por una semana a 37 °C en la incubadora marca ESCO IFA-110-8.

4.5.1.4. Aislamiento Agar TSA y Cetrimida

- Se preparó cuatro cajas Petri con Agar TSA y cuatro con Agar Cetrimida.

- En un área estéril se realizó la técnica de agotamiento por estrías diluyendo la primera siembra de cada agar.
- En cada caja Petri se escribieron los siguientes datos: Tipo de Agar, Fecha, Nombres, Matraz erlenmeyer en referencia y repetición efectuada (Véase Anexo 12).
- Se incubaron por 48 horas a 25 °C

4.6. Identificación Microbiana

Las colonias aisladas que fueron obtenidas de las resiembras de los medios preparados se identificaron de acuerdo a la técnica de tinción Gram.

4.6.1. Tinción Gram

- Se realizó la tinción Gram y se procedió con el análisis de la muestra en el microscopio marca Micros Austria con el lente de 100x, adicionando previamente una gota de aceite de inmersión.

4.6.2. Preparación de Muestra Madre

- En un matraz erlenmeyer se dispuso 3g de TSB aforándolo a 100 mL.
- En una plancha de calentamiento marca Velp Scientifica modelo FL0510100 se llevó a ebullición por un minuto.
- Se traspasó 10 mL del caldo TSB a cada uno de los 5 tubos de ensayo con tapa rosca mediante una pipeta de 10 mL.
- Se colocó en una gradilla los tubos y se colocaron en el autoclave.
- Se seleccionó 5 cajas Petri con microorganismos aislados.
- Se inoculó cerca de un mechero Bunsen con un asa de platino en cada uno de los tubos de ensayo numerándolos respectivamente.

- Se colocó los tubos inoculados en una incubadora marca N-BIOTEK modelo NB-1080 por 48 horas a 23 °C (Véase Anexo 13).

4.6.3. Dilución y Conteo Bacteriano

- En dos matraces erlenmeyer se dispuso 13.5 g de TSB y se aforó a 0.450 l.
- En dos matraces erlenmeyer se dispuso 16 g de TSA y se aforó a 0.4 l.
- En una plancha de calentamiento marca Velp Scientifica modelo FL0510100 se llevó a ebullición por un minuto cada matraz.
- Se traspasó 10 mL del caldo TSB a cada uno de los 20 tubos de ensayo con tapa rosca mediante una pipeta de 10 mL.
- Se dispensó 99 mL de TSB en 5 balones de aforo de 100 mL, tapándolos con papel aluminio.
- Se colocó dentro del autoclave en una gradilla los tubos de ensayo junto con 20 cajas Petri, puntas de micro pipeta, los balones aforados y los matraces de agar TSA.
- Se dispensó el agar TSA en las 20 cajas Petri dentro de la campana de extracción marca ISOCIDE modelo ESCO 5152.
- Cerca del mechero de Bunsen se toma 1 mL de la muestra madre previamente agitada y se coloca en un balón de aforo. Esto para cada uno de los 5 cultivos iniciales. Siendo esta la dilución 10^{-1} (Véase Anexo 14).
- Se agitan los balones aforados por un minuto y se toma 1 mL de estos con ayuda de una micropipeta.
- Se depositó en un tubo de ensayo y se lo agitó por un minuto. Siendo esta la dilución correspondiente a 10^{-2} .
- Se tomó 1 mL de la dilución 10^{-2} y se dispuso en un tubo de ensayo, posteriormente se lo agitó por un minuto. Siendo esta la dilución 10^{-3} .

- Se repitió este procedimiento con los 5 cultivos madres hasta alcanzar el factor de dilución 10^{-5} (Véase Anexo 15).
- Se tomó 0.1 mL de cada dilución realizada y se esparció en cada una de las cajas Petri con la ayuda del asa de Drigalsky. Todo esto cerca de un mechero de Bunsen.
- Pasado 10 minutos se colocaron las 20 cajas Petri dentro de la incubadora marca N-BIOTEK modelo NB-1080 a 23° C por 48 horas.
- Transcurrido el tiempo mencionado se retiran las cajas de la incubadora y se procede al conteo de colonias siguiente el parámetro: 30-300 colonias considerando al resto como incontable (Véase Anexos 16 y 17).

4.6.4. Pruebas Bioquímicas

4.6.4.1. Prueba de Oxidasa

- Se realizó resiembras de los cultivos en medio TSA y posteriormente se incubó a una temperatura de 25 °C durante 24 horas.
- Se esterilizó cajas Petri para la prueba de Oxidasa.
- Se colocó tiras Oxistrips marca Hardy Diagnostics en las cajas Petri.
- Se adicionó una gota de agua en cada una de las tiras.
- Se inoculó con el asa de platino esterilizada una colonia de la bacteria y se procedió a realizar un frotis en el área húmeda.
- Se esperó 30 segundos para realizar la determinación del cambio de color y se anotó el resultado.

4.6.4.2. Preparación del reactivo de Kovacs

- Se pesó 0.1057 g de 4-dimetil-amino-benzaldehído y se adicionó a 8 mL de alcohol butílico en un balón de aforo de 10 mL.

- Posterior a esto se adicionó 2 mL de ácido clorhídrico.
- Se agitó hasta homogenizar la solución y se volvió de color amarillo claro.

4.6.4.3. Prueba en medio SIM (Sulfuro, Indol, Motilidad)

- Se preparó el agar pesando 29.8 g de Criterion Medio SIM marca Hardy Diagnostics en 1 litro de agua destilada.
- Se calentó y se agitó hasta el punto de ebullición en la plancha de calentamiento y posteriormente se dispuso 10 mL en tubos de ensayo con tapa rosca.
- Se colocó en la autoclave durante 2 horas y media y posterior se sacó del mismo para su enfriamiento y solidificación.
- A continuación, con la ayuda de una aguja de siembra y alado de un mechero de Bunsen se realizó en tríplica la inoculación de cada una de las bacterias.
- Se incubaron los tubos de ensayo a 35 °C en condiciones aerobias durante 24 horas.
- Transcurrido ese tiempo se observó los tubos para la toma de resultados y además se colocó 3 gotas de reactivo de Kovacs preparado con anterioridad para la determinación de la producción de Indol.

4.6.4.4. Kit Microgen GN ID A+B

De acuerdo con Microgen Bioproducts (2007) el procedimiento a realizar para la identificación de microorganismos Gram negativos, es la siguiente y cito:

4.6.4.4.1. Inoculación e Incubaciones.

1. Hacer un test oxidasa del organismo aislado. Los organismos oxidasa positivos solo se pueden identificar inoculando tanto las tiras del GN A como GN B.

2. Emulsificar una única colonia obtenida de un cultivo de 18-24 horas en 3 mL de solución salina estéril 0.85% para la tira GN A. Si se van a inocular ambas tiras, GN A y GN B, la colonia se debe emulsificar en 3-5mL de solución salina estéril 0.85%. Mezclar bien.
3. Quitar la lámina adhesiva que sella los pocillos cuidadosamente. NO tirar la tira adhesiva, que a posteriori se volverá a necesitar.
4. Usando una pipeta Pasteur estéril, añadir 3-4 gotas (aproximadamente 100µL) de la suspensión bacteriana a cada pocillo de la tira(s).
5. Para comprobar la pureza del inóculo, transferir 1 gota de la suspensión bacteriana a una placa de medio no-selectivo. Incubar la placa aeróbicamente a 35-37°C durante 18-24 horas.
6. Después de la inoculación, revestir los pocillos 1,2 y 3 (numerar la tira GN A empezando por el final de la etiqueta) y pocillos 20 y 24 (tira GN B – el pocillo 13 es al final de la etiqueta) con 3-4 gotas de aceite mineral. (NO añadir aceite en el pocillo 20 si el organismo aislado es oxidasa positivo). Estos pocillos están marcados con un círculo Negro alrededor para facilitar su identificación.
7. Sellar la parte superior de la tira(s) con la cinta adhesiva que se había retirado antes e incubar a 35-37°C. Asegurarse que los “agujeros” de la cinta adhesiva están sobre los pocillos 7, 11 y 12 en la tira GN A strip y sobre el pocillo 14 en la tira GN B.
8. Las tiras GN A t GN B se leerán después de 18-24 horas de incubación para las Enterobacteriaceae, y tras 48 horas para los aislados oxidasa positivos.

4.6.4.4.2. *Lectura y Adición de Reactivos*

Tira GNA

1. Quitar la cinta adhesiva y anotar todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color (Véase Anexo 18). Anotar los resultados en la hoja de resultados proporcionada (Véase Anexo 19).

2. Añadir los reactivos apropiados a los siguientes micropocillos: a) Añadir 2 gotas de reactivo Kovacs al pocillo 8. Leer y anotar los resultados después de 60 segundos. Formación de color rojo indica un resultado positivo. b) Añadir 1 gota del reactivo VP I y 1 gota del reactivo VP II al pocillo 10 y leer y anotar los resultados tras 15-30 minutos. La formación de un color rosa / rojo indica un resultado positivo. c) Añadir 1 gota del reactivo TDA al pocillo 12 y leer después de 60 segundos. La formación de un color rojo cereza indica un resultado positivo.

3. Hacer el test de reducción de nitrato al pocillo 7 después de leer y anotar el resultado del test ONPG. Añadir 1 gota del reactivo Nitrato A y una gota del reactivo Nitrato B al pocillo y leer después de 60 segundos. El desarrollo de color rojo indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito. Si el pocillo 7 se mantiene amarillo o incoloro después de la adición de los reactivos nitrato, añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc. Esto indicará si el nitrato ha sido completamente reducido a nitrógeno gas.

4. Anotar estos resultados adicionales en la hoja de resultados proporcionada.

Tira GNB

1. Quitar la cinta adhesiva y anotar todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color (Véase Anexo 18). Anotar los resultados en la hoja de resultados proporcionada (Véase Anexo 19).

2. Leer los pocillos específicos según se indica: a) El pocillo de gelatina (13) se debe leer tras 18-24 horas para Enterobacteriaceae y tras 48 horas para los aislados oxidasa positivos. Si se observan partículas negras a través del pocillo es indicativo de un resultado positivo de licuefacción de la gelatina. b) El pocillo de la arginina se interpreta diferente tras 24 y 48 horas de incubación:

24 horas (Enterobacteriaceae) Amarillo = Negativo; Verde/Azul = Positivo

48 horas

(Organismos Oxidasa positivos) Amarillo / verde = Negativo; Azul = Positivo.

(Microgen Bioproducts, 2007).

4.7. Análisis de crecimiento bacteriano

4.7.1. Elaboración de la curva de calibración McFarland

- Se preparó una dilución de ácido sulfúrico al 1% tomando 1 mL de H₂SO₄ de Merck y depositándolo en un balón aforado de 100 mL completando con agua destilada.
- Se realizó una dilución de cloruro de bario dihidratado de Fisher Scientific, tomando 1.1795 g y aforándolo a 100 mL de agua destilada.
- Para la preparación de estándares, se mezcló estas dos diluciones y se tomó los valores para cada estándar, mediante el turbidímetro marca Orbeco TB200 (Véase Anexos 20 y 21).

4.8.Experimento

Se colocó en 12 matraces Erlenmeyer cada uno con 250 mL de agua residual y se inoculó 1 mL de un cultivo bacteriano de 48 horas de cada uno de los microorganismos preparado en caldo TSB. Se agitó constantemente y se tomaron los parámetros de pH, turbidez y cromo hexavalente por 3 días seguidos con el espectrofotómetro marca Jasco modelo V-630

4.8.1. Controles para el experimento

4.8.1.1. Control positivo

Para este Control se tomó en cuenta el cromo hexavalente del agua residual de la curtiduría Serrano, la cual se encuentra en una concentración promedio de 2.5 ppm. Las bacterias resistentes previamente aisladas sobreviven a esta cantidad de cromo por lo cual se preparó la solución con dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ de Loba Chemie.

Se colocó en 4 matraces erlenmeyer y se inoculó 1 mL de un cultivo de 48 horas de cada uno de los microorganismos preparado en caldo TSB junto a un mechero de Bunsen, para garantizar la esterilidad del entorno. Se agitó constantemente y se tomaron los parámetros de pH, turbidez y cromo hexavalente por 3 días seguidos con el espectrofotómetro marca Jasco modelo V-630.

4.8.1.2. Control negativo

El analito a considerar serán los consorcios microbianos y su acción contra el cromo en el agua residual, por lo tanto, para eliminar esta variable del agua se autoclavó 400 mL de agua residual en un frasco con tapa rosca y se realizó durante 3 días el mismo tratamiento y digestión dado a las muestras con bacterias para

determinar la variación del cromo hexavalente con la ayuda del espectrofotómetro y el programa Spectra Manager.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Muestras

Se obtuvo un total de 13 muestras de agua residual de 1 L, 2 muestras de lodo sólido y 2 muestras de lodo líquido provenientes de la industria “Curtiduría Serrano” (Véase Anexo 22 y 23).

5.2. Caracterización Bioquímica del Agua

Las características del agua residual fueron analizadas en el laboratorio de química y química instrumental de la Universidad Politécnica Salesiana y se presentan los promedios de los datos tomados en tríplica.

Tabla 1

Parámetros Físicos y Químicos del Agua

Parámetro	Resultado	Unidades
Conductividad	78.86	mS/cm
Oxígeno disuelto	0.653	mg/L
pH	pH agua residual: 3.02	
	pH Lodos de cromo: 9	
Temperatura	20.63	°C
Turbidez	1.42	NTU
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	3380	mg/L
Color aparente	5600	PCU
Color real	6133.33	PCU

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

En la Tabla 1 tenemos los valores resultantes de los muestreos realizados a la industria de curtiembre, de lo cual se puede destacar que el agua presenta valores ácidos de pH, mientras que los lodos sólidos residuales son básicos.

La demanda química de oxígeno correspondiente a 3800 mg/L se puede considerar un valor alto ya que el límite máximo permisible de DQO vigente en el Ecuador es de 500 mg/L y según Laguna & Manrique (2014), los valores elevados de DQO indican poca biodegradabilidad de la materia orgánica presente en el agua residual del proceso.

Se tiene una turbidez de 1.42 NTU y el color real del agua es 6133.33 PCU, según Chafla (2011), la turbidez y color del agua en estudio puede verse afectada por la cantidad de sólidos suspendidos que se encuentran en ella, constituyendo un problema en las características físicas de la muestra.

5.2.1. Demanda Bioquímica de Oxígeno

De acuerdo con el manual de operaciones del equipo Velp Scientifica para determinación manométrica de la DBO, la D.B.O. real se calcula mediante la resta del blanco y a continuación se multiplica por el factor de dilución utilizado si es el caso (Véase Anexo 24). Para este caso no se realizaron diluciones de la muestra y los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 2

Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5)

Escala (mgO ₂ /L)	Volumen de la muestra (mL)	Resultado a los 5 días (mgO ₂ /L)
Blanco	250	1

0 + 600	150	96
0 + 250	250	87
0 + 90	400	47.68

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

En la Tabla 2 se puede observar los diferentes resultados de la Demanda Bioquímica de Oxígeno a los cinco días y se debe destacar que el valor de la DBO real en promedio corresponde a 75.89 mg/L.

El valor bajo de la DBO se refiere a que en el proceso de curtido casi no existen restos de materia orgánica, de acuerdo con Chafla (2011), los valores de DBO están relacionados especialmente a la presencia de pelo, proteínas y sus productos de degradación, siendo así el pelambre la etapa más aportante a este parámetro.

5.2.2. Sólidos en el agua residual

5.2.2.1. Sólidos Totales (ST)

Tabla 3

Cálculo de Sólidos Totales

Peso mojado + crisol (mg)	Peso seco (mg)	Sólidos totales (%)	Sólidos totales (mg/L)
161575.73 ± 634.64	63779.67 ± 722.37	7.77 ± 0.39	82399.33 ± 4047.35

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

Se realizó el cálculo del porcentaje de sólidos totales en la muestra de agua residual, siendo que en la Tabla 3 nos muestra el promedio de los valores de las 3 repeticiones efectuadas y cuyo valor promedio corresponde a 82399.33 mg/L de sólidos totales con una desviación estándar de 4047.35 mg/L.

Laguna & Manrique (2014), indican que la cantidad encontrada de sólidos totales, suspendidos y disueltos se deben a residuos provenientes de procesos previos a la curtición, que quedan como remanentes en el efluente, de esta manera en la etapa final que es el curtido no existirá tanta materia orgánica en las pieles, en este caso el promedio del porcentaje de sólidos totales en la muestra es de 7.77%.

5.2.2.2. *SFT (Sólidos Fijos Totales)*

Tabla 4

Cálculo de Sólidos Fijos Totales

Peso crisol (mg)	Peso seco (mg)	Peso calcinado (mg)	Sólidos fijos (mg/L)
55539.9 ± 584.68	63779.67 ± 722.37	62893.17 ± 610.45	73532.67 ± 685.23

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

Dentro de la Tabla 4 se puede observar el cálculo de los sólidos fijos en 3 repeticiones en base al peso seco y peso de la muestra calcinada, obteniendo un valor promedio de 73532.67 mg/L con una desviación estándar de 685.23 mg/L.

5.2.2.3. *Cálculo SVT (Sólidos Volátiles Totales)*

Tabla 5

Cálculo de Sólidos Volátiles

Peso crisol (mg)	Peso seco (mg)	Peso calcinado (mg)	Sólidos volátiles (mg/L)
55824.1 ± 446.18	64196.6 ± 25.17	63208.4 ± 386.08	9882 ± 4112.53

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

La Tabla 5 se refiere al cálculo realizado para la determinación de los sólidos volátiles totales existentes en la muestra de agua residual, siendo que en promedio se tiene 9982 mg/L de SVT con una desviación de 4112.53 mg/L (Véase Anexo 25).

5.2.2.4. *Sólidos Disueltos Totales (SDT)*

Para obtener el valor promedio se realizó la toma de datos el pHmetro en tríplica y el valor corresponde a 51.7 g/L.

5.2.2.5. *Sólidos Sedimentables (SS)*

Se observó en cono Imhoff los sólidos resultantes y corresponde al valor de 2 mL/L. Para más referencia véase Anexo 26.

5.2.2.6. *Humedad de la muestra*

Tabla 6

Cálculo de Humedad relativa de la muestra

Peso crisol + agua residual (mg)	Peso calcinado (mg)	Humedad (%)
106037.83 ± 82.34	62893.17 ± 610.45	40.69% ± 0.27%

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

Se realizó el cálculo del porcentaje de humedad, en base a los cálculos descritos por APHA (2005), y cuyos valores se muestra su valor en promedio en la Tabla 6, junto con la desviación estándar calculada en base a 3 repeticiones se determinó que el valor promedio de humedad de la muestra corresponde a 40.69 % ± 0.27%.

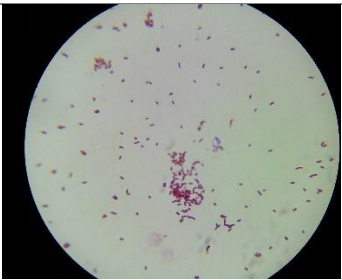
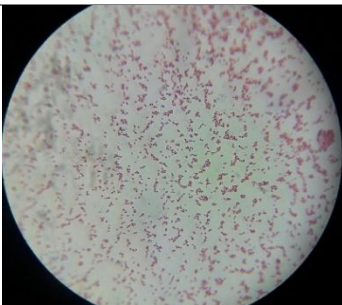
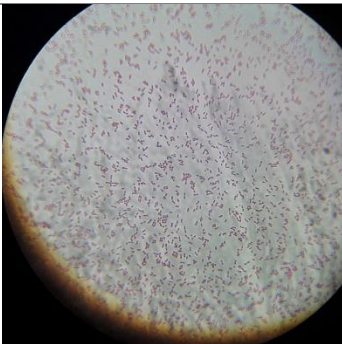
5.3. Identificación Microbiana

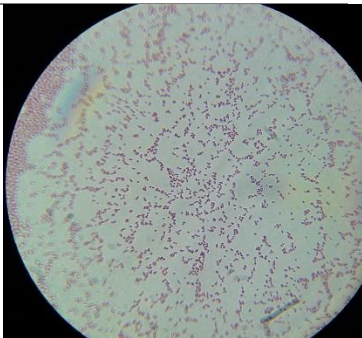
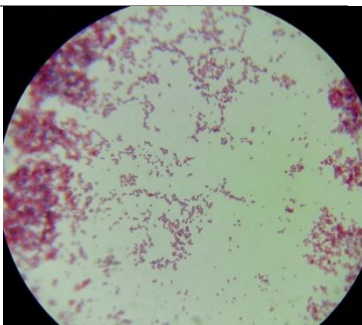
Para la identificación de los microorganismos se aisló cada uno de ellos durante varias semanas hasta observar un crecimiento separado de las colonias en las cajas

Petri, para más referencia véase anexo 27. Los resultados de la tinción Gram se detallan a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 7

Identificación de cultivos aislados

Cultivo	Identificación Gram	Forma	Identificación macroscópica	Identificación microscópica
Bacteria aislada 1	Negativa	Bacilos	Colonias blancas y convexas	
Bacteria aislada 2	Negativa	Cocos	Colonias pequeñas, convexas.	
Bacteria aislada 3	Negativa	Bacilos	Colonias blanquecinas y dispuestas de manera convexa.	

Bacteria aislada 4	Negativa	Bacilos	Colonias de pequeño tamaño y blanquecinas	
Bacteria aislada 5	Negativa	Bacilos	Colonias pequeñas y de color blanco	

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

Como se puede observar en la Tabla 7, los microorganismos aislados se miraron a través de un lente de 100x, y resultaron en su mayoría ser bacilos Gram negativos, en el caso de la bacteria aislada 2 se logró determinar cocos Gram negativos.

5.3.1. Recuento Bacteriano

El criterio utilizado fue de 30-300 UFC por caja, siendo que valores menores o mayores a este rango se lo consideró incontable (Véase Anexo 27 y 28).

Tabla 8

Conteo en placa de los cultivos aislados

Cultivo	UFC/mL de muestra
Bacteria aislada 1	7.2×10^6
Bacteria aislada 2	2.21×10^9
Bacteria aislada 3	3.49×10^7

Bacteria aislada 4	4.065×10^6
Bacteria aislada 5	1.84×10^6

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

Dentro de la Tabla 8 se puede observar el cálculo de la cantidad de colonias existentes en un mililitro de muestra de cada una de las bacterias aisladas de acuerdo con las diluciones realizadas.

El mayor número de bacterias por mililitro se lo encuentra en la bacteria 2 mientras que la bacteria 5 cuenta con el menor número de unidades formadoras de colonias por mililitro.

5.3.2. Curva de Calibración McFarland

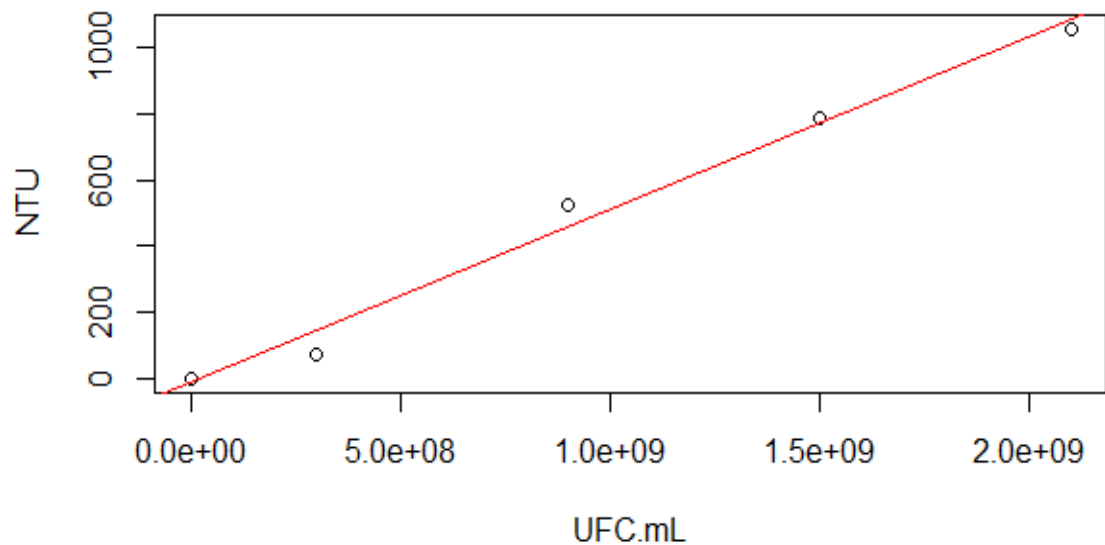


Gráfico 1. Curva de calibración McFarland

El eje de las abscisas representa las Unidades Nefelométricas (NTU), mientras que el eje de las ordenadas constituye las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra (UFC/mL).

La curva de calibración de McFarland presente en el Gráfico 1, nos permite obtener la ecuación (5) que describe la concentración bacteriana con respecto a la turbidez de la muestra y se presenta a continuación:

Ecuación 5

$$Y = 5.239 \times 10^{-7} X - 15.34$$

Donde:

Y= Turbidez de la muestra en NTU

X=Concentración Bacteriana por mililitro de muestra UFC/mL

El valor de R^2 fue de 0.9821.

El siguiente gráfico fue realizado en el programa RStudio versión 3.5.1, realizando primero una regresión lineal con los datos de calibración:

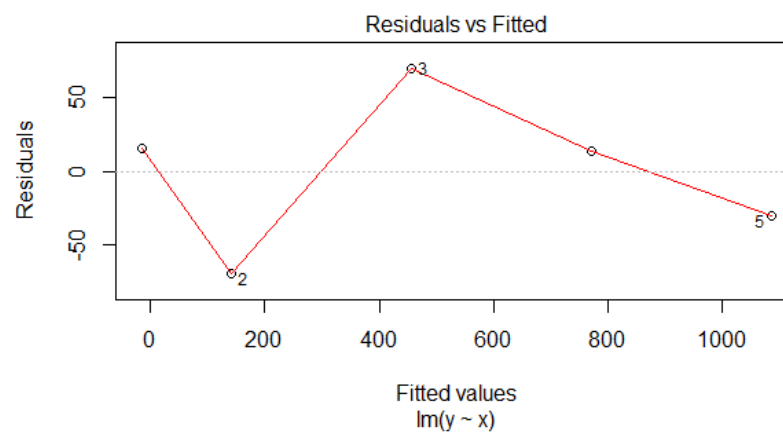


Gráfico 2. Valores residuales vs valores ajustados

5.3.3. Prueba de Oxidasa

Se realizó la prueba de oxidasa con Oxistrips de Hardy Diagnostics (Véase Anexo 29), la prueba se la hizo en tríplica para una mayor seguridad de los resultados y se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 9

Prueba de Oxidasa

Cultivo	Oxidasa
Bacteria aislada 1	Negativa
Bacteria aislada 2	Negativa
Bacteria aislada 3	Positiva
Bacteria aislada 4	Positiva
Bacteria aislada 5	Positiva

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

La Tabla 9 nos muestra un resultado negativo para las bacterias aisladas 1 y 2, es decir, no hubo una coloración de la tira de Oxidasa, mientras que las bacterias restantes lograron teñirla de un color púrpura, demostrando ser positivas a esta prueba (Véase Anexo 30).

5.3.4. Prueba de Sulfuro, Indol y Motilidad

Para esta prueba se utilizó Medio SIM de Hardy Diagnostics (Véase Anexo 31) y se realizaron 3 repeticiones para cada una de las bacterias, se presentan los resultados en la siguiente tabla:

Tabla 10

Prueba agar SIM

Cultivo	Producción de H₂S	Producción de Indol	Motilidad
Bacteria aislada 1	Negativa	Negativa	Positiva
Bacteria aislada 2	Negativa	Negativa	Negativa

Bacteria aislada 3	Negativa	Negativa	Positiva
Bacteria aislada 4	Negativa	Negativa	Positiva
Bacteria aislada 5	Negativa	Negativa	Positiva

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

La Tabla 10 nos muestra los resultados observados en los tubos de ensayo que no tuvieron un cambio de color, dando como resultado negativo en la producción de sulfuro de hidrógeno. Para la prueba de Indol, no se evidenció variación de color para ningún tubo de ensayo por lo tanto se marcaron todos como negativos (Véase Anexo 32).

Se registró movimiento en los tubos de ensayo, en su mayoría en la parte superior dando a conocer que todas las bacterias son aerobias; salvo el caso de la bacteria aislada 2 y bacteria aislada 4 en las que se observó crecimiento incluso en la parte inferior del tubo dando a conocer que se tratan de bacterias facultativas.

5.3.5. Prueba con kit de pruebas bioquímicas

Se inoculó en un área estéril, siguiendo el procedimiento descrito (Véase Anexo 33) y los resultados del Kit Microgen GN ID A+B para bacterias Gram negativas con oxidasa positiva y negativa respectivamente se muestran a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 11

Identificación microbiana

Cultivo aislado	Nombre y Especie	Porcentaje de Probabilidad
Bacteria aislada 1	<i>Hafnia alvei biogp 1</i>	86.29%

Bacteria aislada 2	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	49.45%
Bacteria aislada 3	<i>Pseudomona fluorescens</i> 35	90.68%
Bacteria aislada 4	<i>Pseudomona stutzeri</i>	72.43 %
Bacteria aislada 5	<i>Pseudomona stutzeri</i>	72.43 %

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

Las pruebas bioquímicas realizadas a cada uno de los cultivos se leyeron tras 24 horas a los organismos oxidasa negativo (Véase Anexo 34) y a las 48 a los organismos oxidasa positivo (Véase Anexos 35, 36 y 37), determinando el nombre y la especie de cada microorganismo.

El código final resultante en cada bacteria se ingresó al programa Microgen ID el cual nos reporta las 5 bacterias más posibles dentro de su base de datos (Véase Anexos 43 al 47), siendo la primera la que tiene más porcentaje de probabilidad.

Las bacterias se caracterizan por presentar diversos medios de adaptación y resiliencia a la contaminación, por lo cual se ha investigado si las bacterias identificadas tienen potencial en el campo de la biorremediación.

5.4. Control positivo

En los siguientes literales se va a expresar el control positivo con cada una de las bacterias en agua sintética a una concentración de 2.5 ppm de cromo hexavalente (Véase Anexo 48), preparada en el laboratorio de la UPS con dicromato de potasio, mezclando en un agitador orbital antes de cada medición (Véase Anexo 49).

5.4.1. Crecimiento Bacteriano

5.4.1.1. *Hafnia alvei*

La bacteria oxidasa negativo identificada como *Hafnia alvei* (Véase Anexo 38), se encontró en el agua de curtido, lo que nos indica la resistencia de la bacteria a

escenarios ambientales extremos. Un estudio realizado por Jeong, Schlegel, Ho, & Ho (2004), menciona que el microorganismo *Hafnia alvei* presenta resistencia al níquel y al cobalto gracias a su capacidad de generación de plásmidos.

Según Padilla et al. (2015), dicha bacteria se la puede encontrar en la flora intestinal de los seres humanos así como en el entorno en suelo y aguas residuales.

Tabla 12

Cinética del crecimiento bacteriano Hafnia alvei

<i>Hafnia alvei</i>				
Parámetro	Simbología	Experimentos	Desviación estándar	Control positivo
Velocidad de crecimiento	k [gen/hora]	0.002042	0.0007413	0.0013894
Tiempo de generación	g [hora/gen]	550.870		719.753
Número de generaciones	n	0.0811	0.0312	0.1

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

La Tabla 12 refleja el crecimiento de la bacteria *Hafnia alvei* y su control positivo. Los valores de cinética de crecimiento han sido calculados en promedio de las tres repeticiones realizadas para cada bacteria, siendo la primera repetición de este microorganismo la que presentó muy poco crecimiento bacteriano en las 56 horas del experimento; sin embargo, las dos repeticiones restantes y el control

reflejan resultados similares, que demuestra su capacidad de crecimiento en aguas con alta presencia de cromo.

5.4.1.2. *Acinetobacter lwoffii*

El segundo microorganismo aislado identificado como *Acinetobacter lwoffii* (Véase Anexo 39), encontrado en el lodo líquido residual después del proceso de tratamiento in situ en la industria, ha sido identificado como una bacteria resistente a metales pesados, por la presencia de plásmidos que contienen genes que confieren la resistencia a estos elementos incluido el cromo (Mindlin et al., 2016).

Tabla 13

Cinética del crecimiento bacteriano Acinetobacter lwoffii

<i>Acinetobacter lwoffii</i>				
Parámetro	Simbología	Experimentos	Desviación estándar	Control positivo
Velocidad de crecimiento	k [gen/hora]	0.003257	0.00152	0.0004825
Tiempo de generación	g [hora/gen]	347.849		2072.593
Número de generaciones	n	0.081	0.003468	0.027019

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

En la Tabla 13 observamos la velocidad de crecimiento de *Acinetobacter lwoffii* con valores relativamente bajos, esto puede deberse al pH de la muestra como menciona (Pulimi, Jamwal, Samuel, & Mukherjee, 2012) los valores máximos de

crecimiento observados para este microorganismo en aguas con contenidos de Cr se obtienen a un pH 7, sin embargo las necesidades nutricionales de carbono y nitrógeno condicionan el crecimiento del microorganismo así como su capacidad de remoción del metal pesado (Pulimi et al., 2012).

5.4.1.3. *Pseudomona fluorescens*

La bacteria aislada e identificada previamente como Gram negativa se identificó como *Pseudomona fluorescens* (Véase Anexo 40), la cual fue hallada en las muestras de lodo líquido residual de la industria. Según un estudio realizado se determinó la resistencia de *Pseudomona fluorescens* al cobre debido a su aislamiento a partir de suelos contaminados con el metal pesado (Dueñas & Quispe, 2011).

Tabla 14

Cinética del crecimiento bacteriano Pseudomona fluorescens

<i>Pseudomona fluorescens</i>				
Parámetro	Simbología	Experimentos	Desviación estándar	Control positivo
Velocidad de crecimiento	k [gen/hora]	0.00538	0.00135	0.004713
Tiempo de generación	g [hora/gen]	192.7		212.14
Número de generaciones	n	0.129	0.0325	0.263975

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

La tabla 14 evidencia una velocidad de crecimiento baja para la bacteria *Pseudomona fluorescens*, sin embargo de acuerdo con Beltrán & Gómez (2016),

algunas bacterias del género *Pseudomona* han mostrado ser eficientes en la bioacumulación de metales pesados en efluentes industriales contaminados.

5.4.1.4. *Pseudomona stutzeri*

Las dos últimas bacterias aisladas oxidasa positivo resultaron ser el mismo microorganismo, siendo este determinado como *Pseudomona stutzeri* (Véase Anexos 41 y 42), esta fue encontrada en el lodo sólido residual al final del proceso de tratamiento de curtido. De acuerdo con Dueñas & Quispe (2011), algunas cepas de *Pseudomona stutzeri* son capaces de fijar el N₂, y también participan o interactúan con metales tóxicos (Dueñas & Quispe, 2011).

Se debe resaltar que la bacteria *Pseudomona stutzeri* no crece en agar Cetrimida, razón por la cual las siembras realizadas con lodo residual en dicho agar se reportaron sin crecimiento en las tres repeticiones realizadas.

Tabla 15

Cinética del crecimiento bacteriano Pseudomona stutzeri

<i>Pseudomona stutzeri</i>				
Parámetro	Simbología	Experimentos	Desviación estándar	Control positivo
Velocidad de crecimiento	k [gen/hora]	0.00328	0.00168	0.0005320
Tiempo de generación	g [hora/gen]	403.47		1880.095
Número de generaciones	n	0.1069	0.0397	0.0297860

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

La Tabla 15 muestra los parámetros de la cinética de crecimiento para *Pseudomona stutzeri*, los cuales según Sathishkumar, Murugan, Benelli, Higuchi, & Rajasekar (2017) son óptimos a rangos de pH (5-10) y temperaturas de (27, 37 y 60°C). Cabe mencionar que la muestra en laboratorio se trató sin modificar los parámetros de la misma, con valores de pH 3 y temperaturas entre (16-18 °C) lo cual implicaría una eficiencia menor de la bacteria.

5.5.Control negativo

Esto corresponde al control de agua residual esterilizada y se expresan los datos tomados en 3 días consecutivos en la siguiente tabla:

Tabla 16

Control negativo

Tiempo	Cromo VI	pH	Temperatura Laboratorio
0	2289.63	2.74	18.7
3	2244.56	2.75	18.8
6	2251.66	2.72	19
9	1951.88	2.74	18.7
24	2956.31	2.71	18.4
27	1803.78	2.72	18.4
30	2780.49	2.75	18.1
33	2577.38	2.74	17.8
48	2659.63	2.74	17.2
51	2660.68	2.71	17.6

54	2356.96	2.72	19.8
57	2308.89	2.72	18
Promedio	2403.48750		

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

Se puede observar en la Tabla 16 que el control negativo obtuvo ligeras variaciones en la concentración final de cromo existente en la muestra, presentado una desviación estándar de 315.7 ppm. Estas variaciones pueden deberse a las características ácidas del agua, donde se encuentra el cromo soluble mientras que a pH básicos tiende a precipitar (Tapia et al., 2002).

Se realizó en una sola repetición y se podrá observar en el siguiente gráfico:

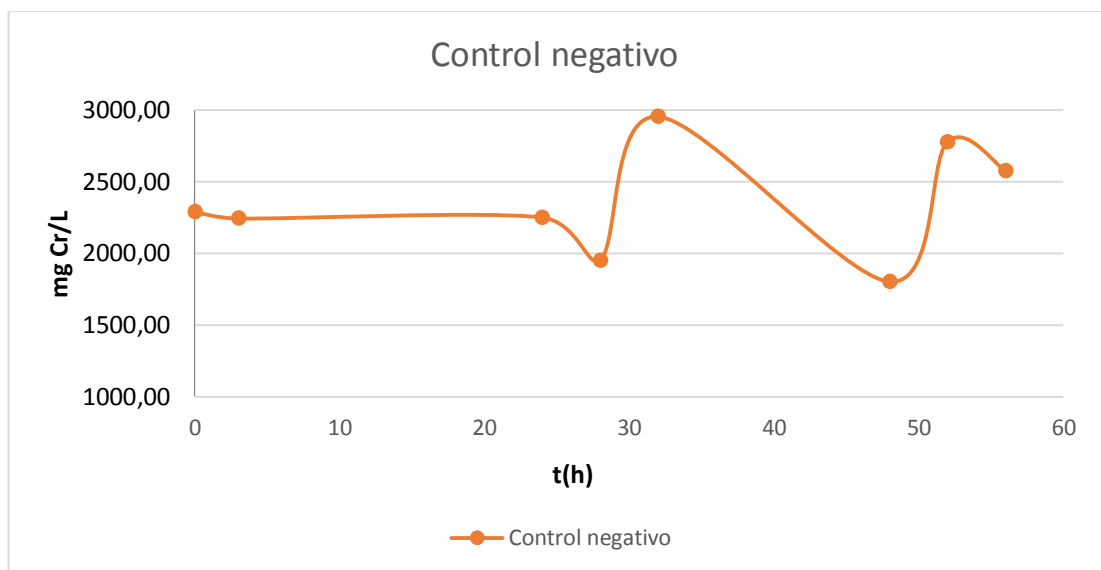


Gráfico 3. Control negativo

5.6. Curvas de Crecimiento Bacteriano

5.6.1. *Hafnia alvei*

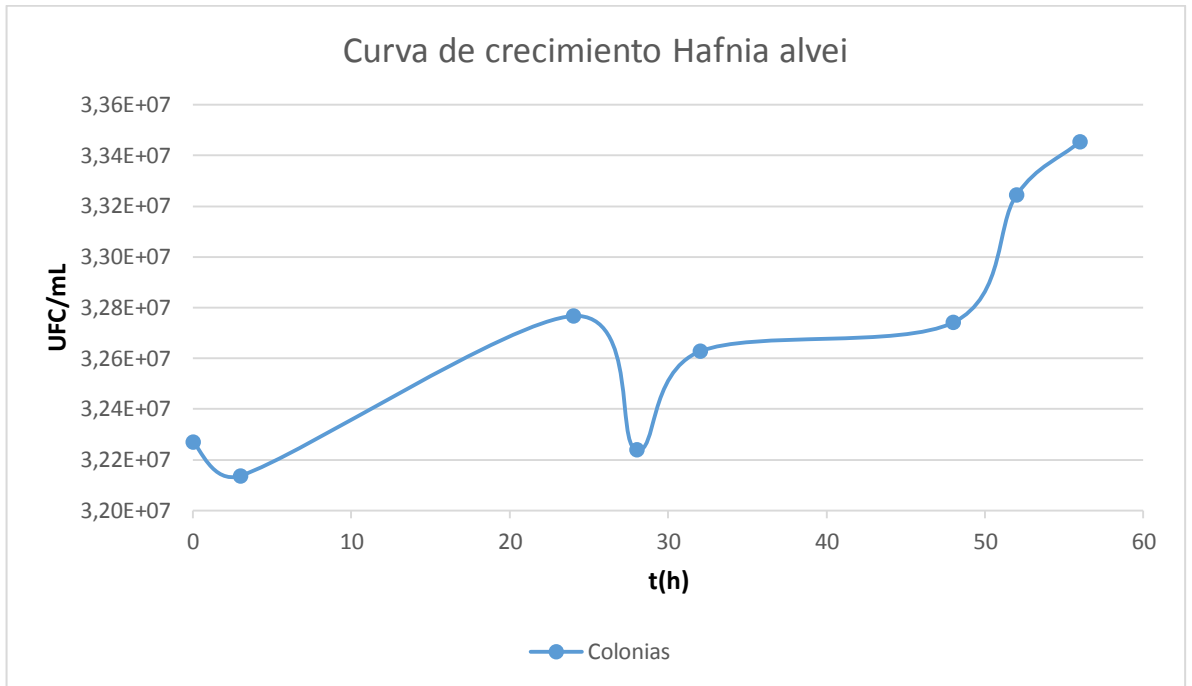


Gráfico 4. Curva de crecimiento bacteriano *Hafnia alvei*

5.6.1.1. Control positivo

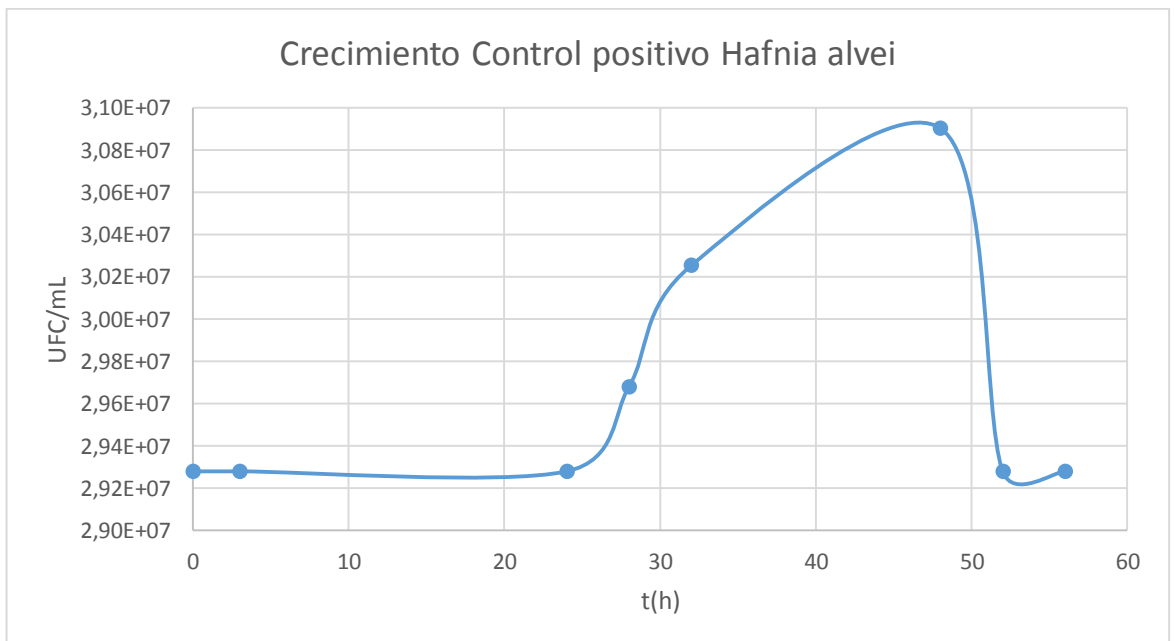


Gráfico 5. Curva de crecimiento bacteriano Control positivo *Hafnia alvei*

En el caso del Gráfico 4 que se refiere al experimento efectuado en tríplica, en el cual se observa un crecimiento exponencial desde las primeras horas, se debe destacar que en el agua residual existen sólidos suspendidos y otros nutrientes que facilitan el desarrollo de los microorganismos, así lo menciona Rivas (2004), que el agua residual normalmente contiene todos los nutrientes en las proporciones necesarias, sin embargo para fines de tratamiento podrán presentarse casos en los que será necesario adicionar algún fertilizante para compensar la deficiencia de algún nutriente (Rivas, 2004).

Como se puede apreciar en el Gráfico 5, la bacteria *Hafnia alvei* se encuentra en proceso de adaptación al medio durante las 20 primeras horas de inoculación y posterior a eso se obtiene un crecimiento exponencial y es a partir de las 48 horas donde se llega a una fase de muerte exponencial que de acuerdo con Moeller & Tomasini (2007), durante esta fase la tasa de mortalidad de las bacterias supera la generación de células nuevas. “La tasa de mortalidad generalmente es una función de la población inversa de la fase de crecimiento exponencial” (Moeller & Tomasini, 2007, p. 14).

5.6.2. *Acinetobacter lwoffii*

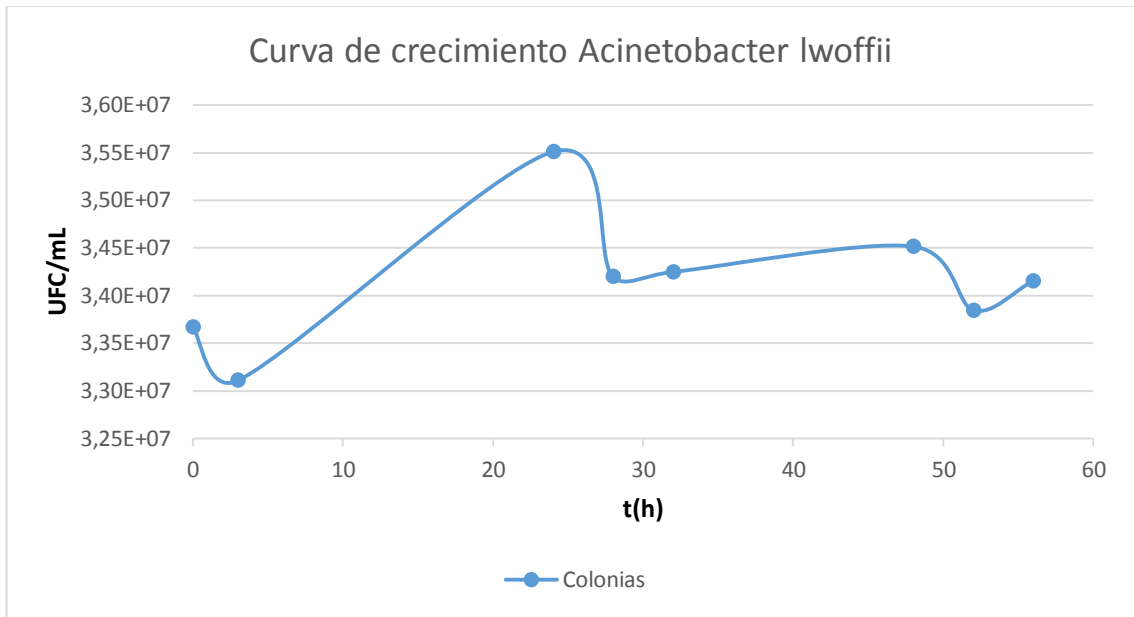


Gráfico 6. Curva de crecimiento bacteriano *Acinetobacter lwoffii*

5.6.2.1. Control positivo

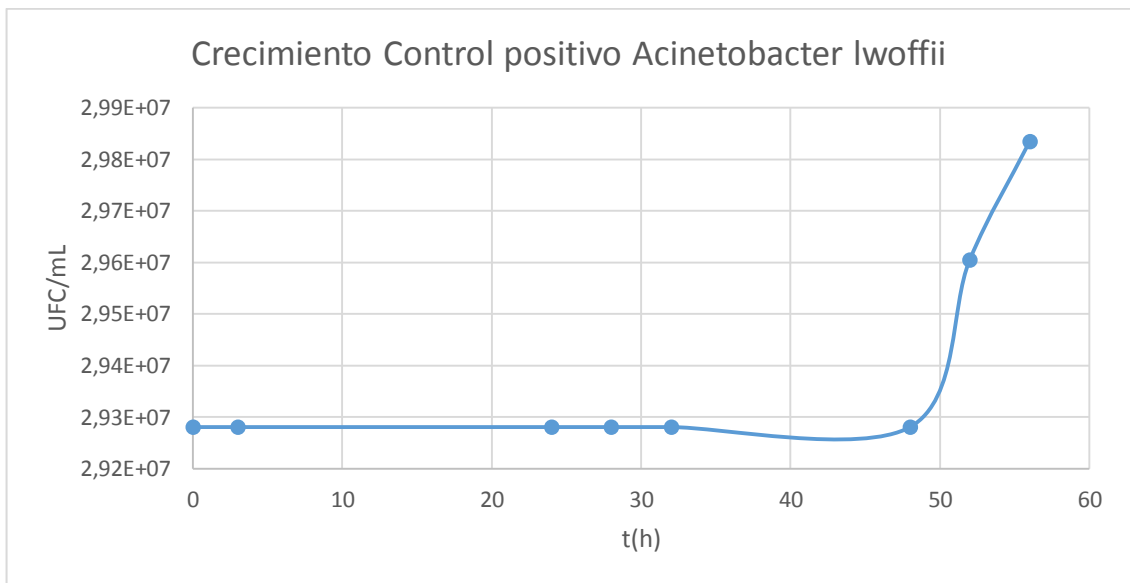


Gráfico 7. Curva de crecimiento bacteriano Control positivo *Acinetobacter lwoffii*

En el Gráfico 6 se puede observar el crecimiento de la bacteria *Acinetobacter lwoffii* en el agua residual y comparado con el Gráfico 7 que es solo el agua con dicromato de potasio se puede afirmar que el agua residual contiene más fuentes de

alimentación para los microorganismos, esto lo ratifica Whitmer (2015), donde menciona que la mayoría de sistemas de tratamiento de aguas residuales dependen de su influente principal para proporcionar nutrientes a los microorganismos, si este influente disminuye puede generar déficit de nutrientes clave o un desequilibrio en el sistema de aguas residuales.

De acuerdo con Moeller & Tomasini (2007), las bacterias son las responsables de la degradación de la materia orgánica y de la transformación de los nutrientes, siendo que el género *Acinetobacter* ha sido utilizado en el proceso de lodos activados.

5.6.3. *Pseudomona fluorescens*

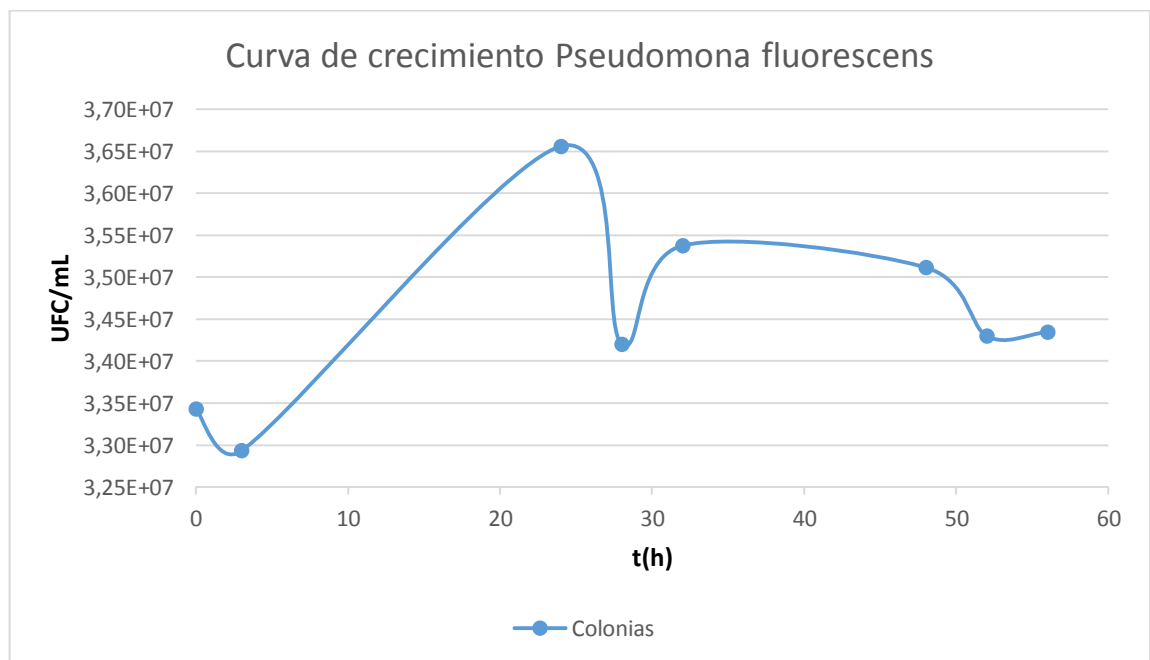


Gráfico 8. Curva de crecimiento bacteriano *Pseudomona fluorescens*

5.6.3.1. Control positivo.

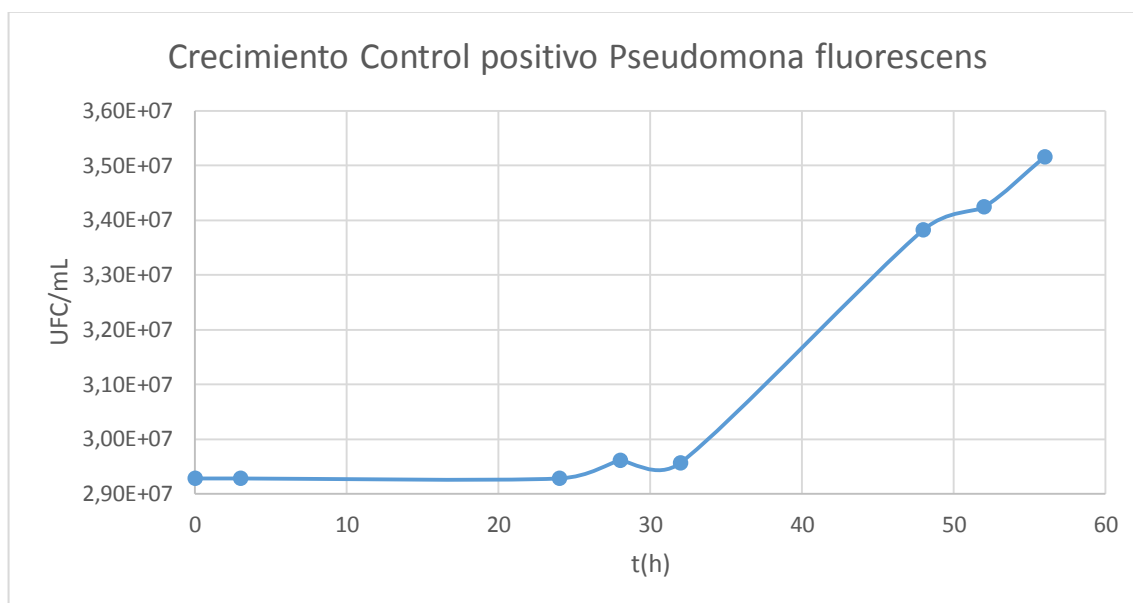


Gráfico 9. Curva de crecimiento control positivo *Pseudomona fluorescens*

Se debe recalcar que esta bacteria fue obtenida en los lodos de la misma industria, siendo que fue una de las que mejor se adaptó al control positivo y en general obtuvo un crecimiento en primera instancia logarítmico hasta las 24 horas y posterior se tiene una disminución en la cantidad de colonias para mantenerse en fase estacionaria tal y como se puede observar en el Gráfico 8. De acuerdo con lo que mencionan Guerrero et al. (2014), una gran variedad de bacterias cuentan con enzimas necesarias para reducir compuestos tóxicos persistentes, y pueden ser aisladas de lugares donde han existido previa exposición al contaminante.

El Gráfico 9 expresa que a las 28 horas la bacteria *Pseudomona fluorescens* obtuvo un crecimiento exponencial el cual continuó hasta la hora 56, lo cual nos indica que el microorganismo tiene un alto crecimiento, esto se comprueba en el número de generaciones calculadas para el control positivo que es de 1880.095. En concordancia con lo que afirman Moeller & Tomasini (2007), la curva exponencial significa un “exceso en la cantidad de alimento que rodea a los microorganismos, y

la velocidad del metabolismo y crecimiento es sólo una función de la habilidad del microorganismo para procesar el sustrato” (p. 14).

5.6.4. *Pseudomona stutzeri*

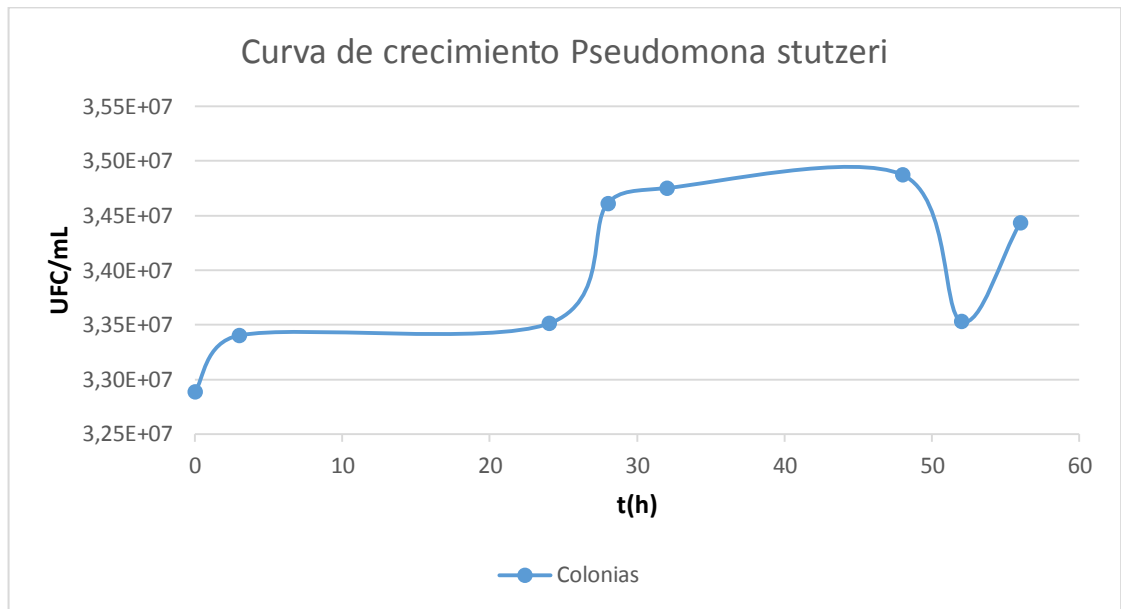


Gráfico 10. Curva de crecimiento bacteriano *Pseudomona stutzeri*

5.6.4.1. Control positivo

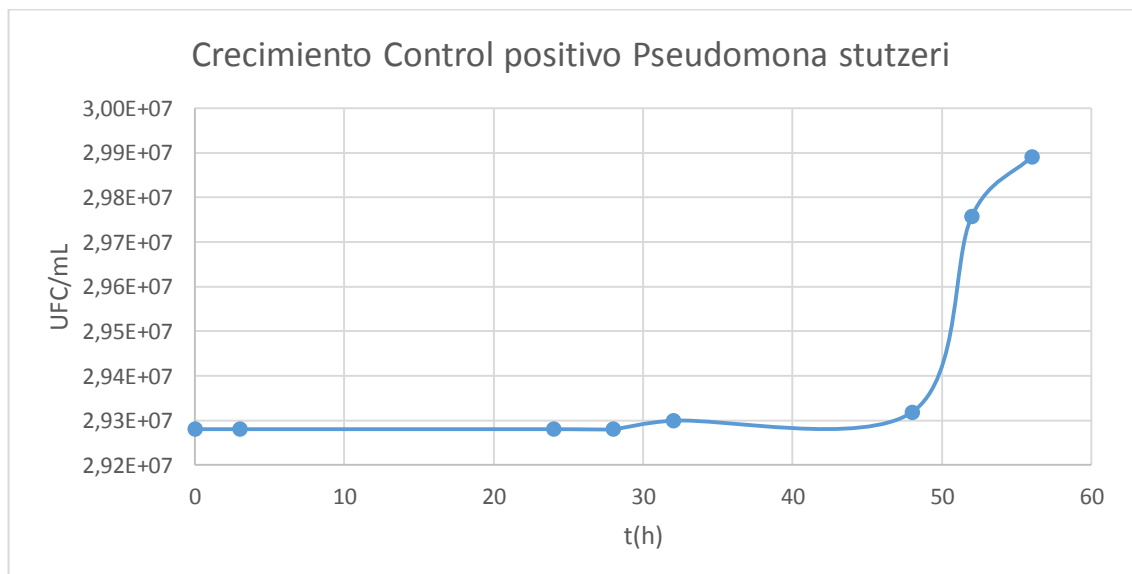


Gráfico 11. Curva de crecimiento bacteriano Control positivo *Pseudomona stutzeri*

Se observa en el Gráfico 10 una curva típica de crecimiento bacteriano, se evidencia al principio una adaptación inmediata al agua residual, seguido a las 24 horas de un crecimiento exponencial para mantenerse en fase estacionaria, hasta las 48 horas donde empieza la fase de muerte. La curva resultante en el Gráfico 11 es similar a lo ocurrido con la bacteria *Pseudomona fluorescens*, demostrando el comportamiento similar de las dos bacterias del mismo género.

En relación a lo que estipulan Mayz & Manzi (2017), el género *Pseudomonas* es el grupo que tiende a ser predominante en todos los hábitats naturales y es considerado fácil de manipular debido a sus simples requerimientos.

5.7. Curvas de reducción del cromo hexavalente

Se realizó el experimento en tríplica con agua residual de la Industria curtiduría Serrano (Véase Anexo 50). Los datos en promedio y con su desviación estándar se presentan en el Anexo 51 y a continuación los gráficos resultantes de dichos datos con su debida interpretación y comparación:

5.7.1. Hafnia alvei

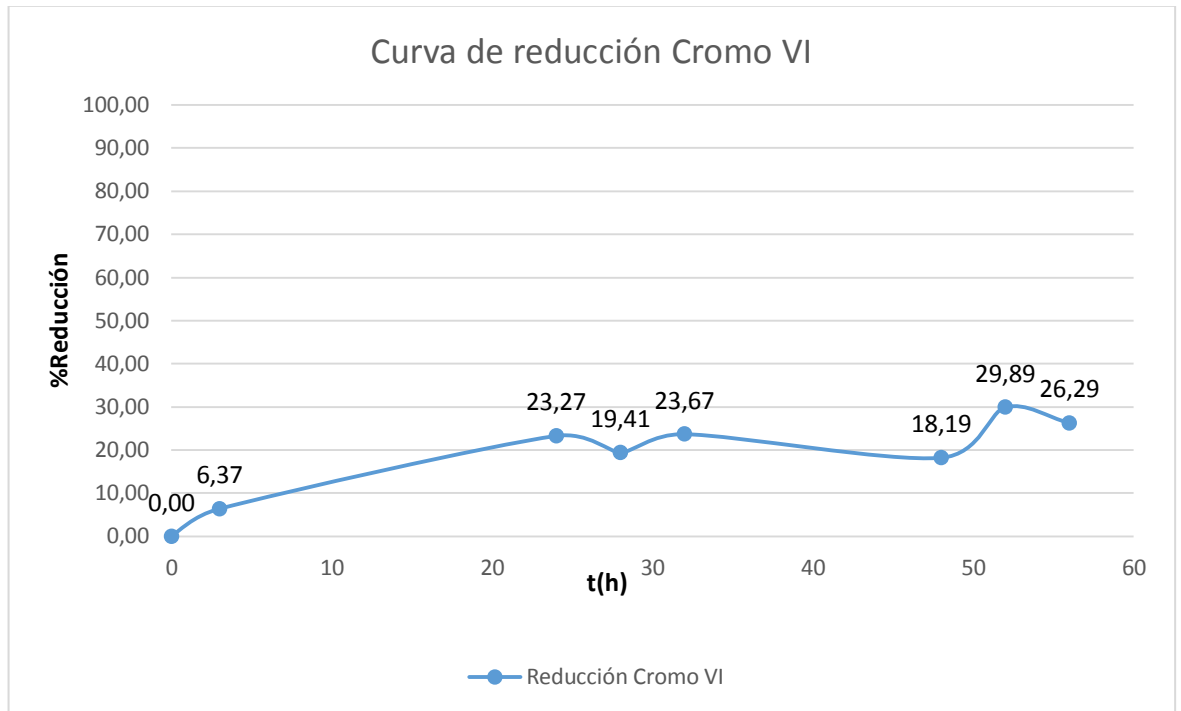


Gráfico 12. Curva de reducción de cromo en agua residual bacteria *Hafnia alvei*

5.7.1.1. Control positivo

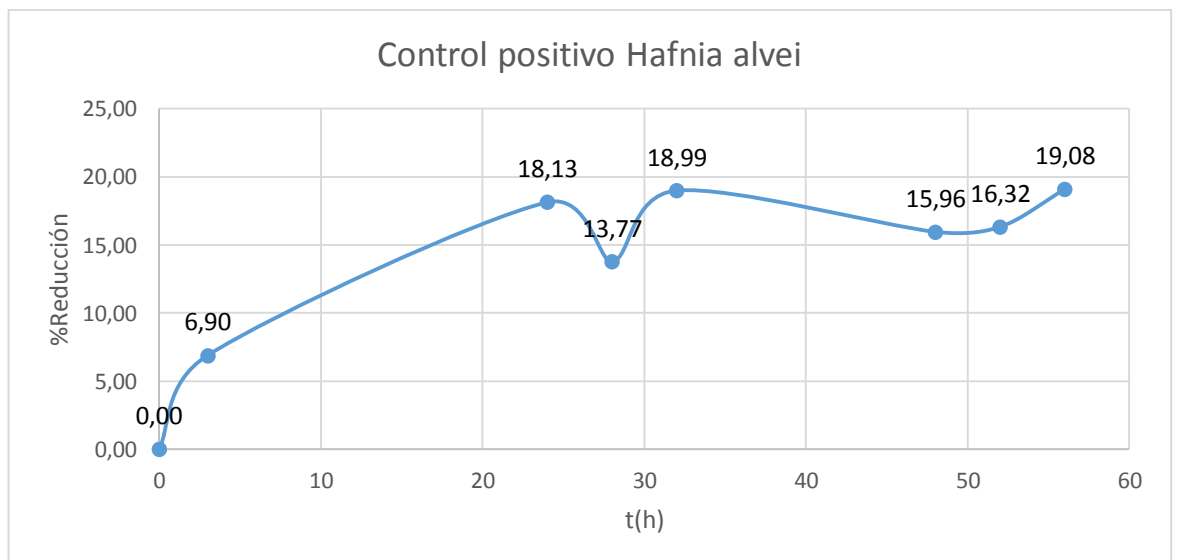


Gráfico 13. Reducción Control positivo *Hafnia alvei*

La bacteria *Hafnia alvei* logró reducir una fracción del metal pesado, siendo que al final tenemos una reducción de 26.29% con una desviación estándar de ± 5.65 ,

comprobando que la bacteria *Hafnia alvei* es resistente al contaminante, así lo reportan Beltrán y Gómez (2016), donde en su investigación efectuada en suelos contaminados con metales pesados se logró encontrar bacterias de algunos géneros, entre ellas del género *Hafnia* (Beltrán & Gómez, 2016).

En las Gráficas de curva de reducción de cromo VI se puede apreciar el control positivo de la muestra con agua sintética, el cual presentó variaciones en el porcentaje de cromo. De acuerdo con bibliografía “la oxidación de Cr (III) a Cr (VI) puede incrementar la movilidad y disponibilidad del metal, mediada por procesos bióticos y abióticos” (Beltrán & Gómez, 2016, p. 6).

Se puede observar en la gráfica 13 correspondiente al control positivo de la muestra que por sí sola la bacteria remueve menos de un 20% del total de cromo, lo cual se podría explicar haciendo referencia a un estudio similar realizado por Guerrero Ceballos et al. (2017), quienes señalan que el tratamiento control por sí mismo, no representó ser un medio de reducción de cromo hexavalente.

5.7.2. *Acinetobacter lwoffii*

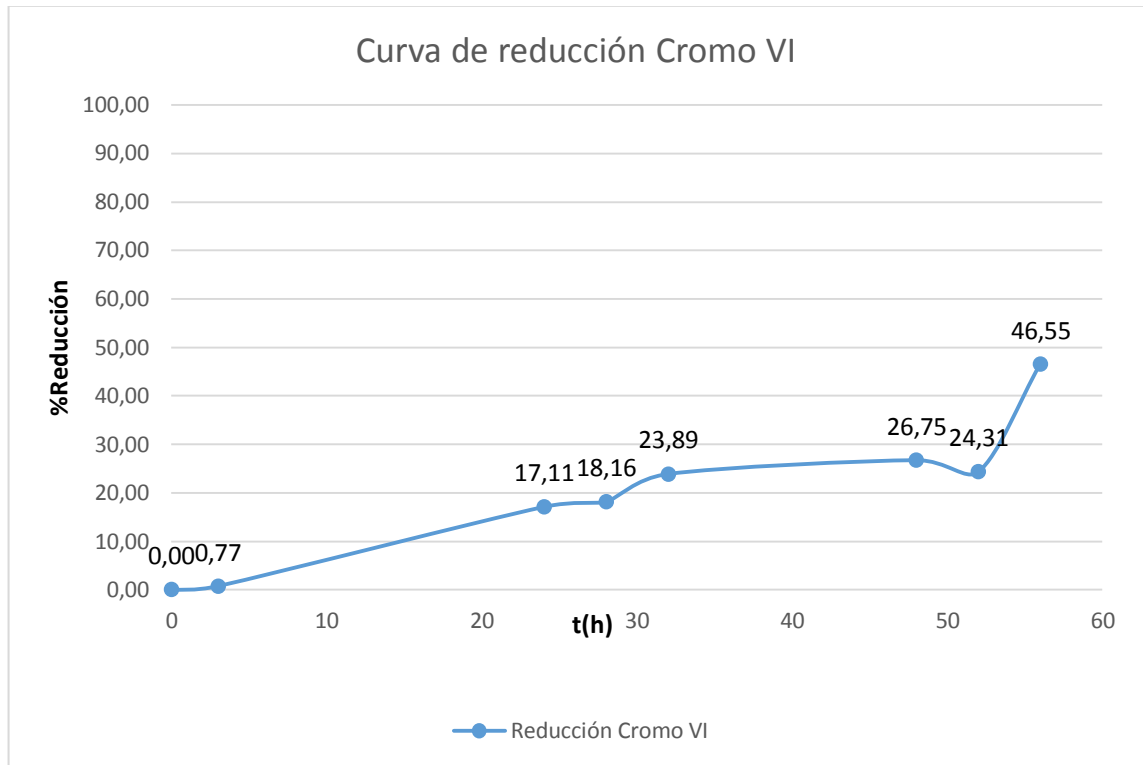


Gráfico 14. Curva de reducción de cromo en agua residual *Acinetobacter lwoffii*

5.7.2.1. Control positivo

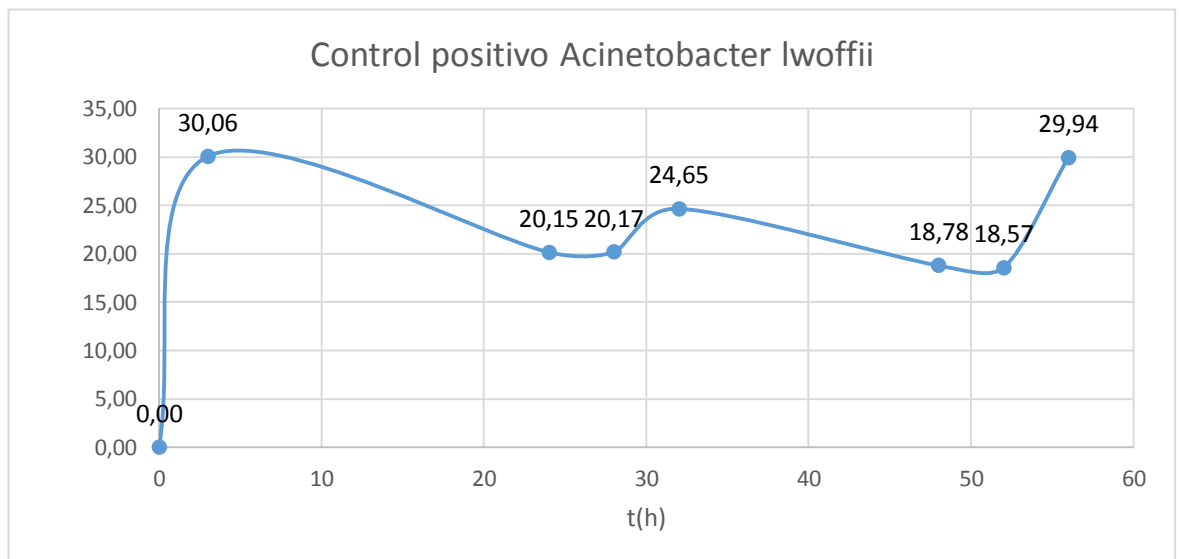


Gráfico 15. Reducción Control positivo *Acinetobacter lwoffii*

Se puede observar en el Gráfico 14, que la bacteria mencionada es efectiva al momento de la reducción del cromo, llegando a un valor de reducción máximo del $46.55\% \pm 4.13\%$, siendo que Garnacho (2004) menciona que el género *Acinetobacter spp* presenta un grave problema debido a la aparición de resistencias y son éstas las que ayudaron a la bacteria a sobrevivir en el medio contaminado.

En una investigación elaborada por Pucci & Tonin (2010), se comprobó que la bacteria *Acinetobacter lwoffii*, presenta tolerancia a la contaminación y se encuentra en sitios con hidrocarburos. En otro estudio verificado por Martínez (2010), se determinó que la bacteria *Acinetobacter lwoffii* presenta resistencia al etanol y hexadecano, ya que fue cultivado en medios con estos contaminantes. Estas dos investigaciones respaldan el Gráfico 15 donde se evidencia una adaptación y crecimiento exponencial en las 3 primeras horas gracias a la capacidad de adaptación de la bacteria, manteniéndose en una fase estacionaria por todo el experimento.

5.7.3. *Pseudomona fluorescens*

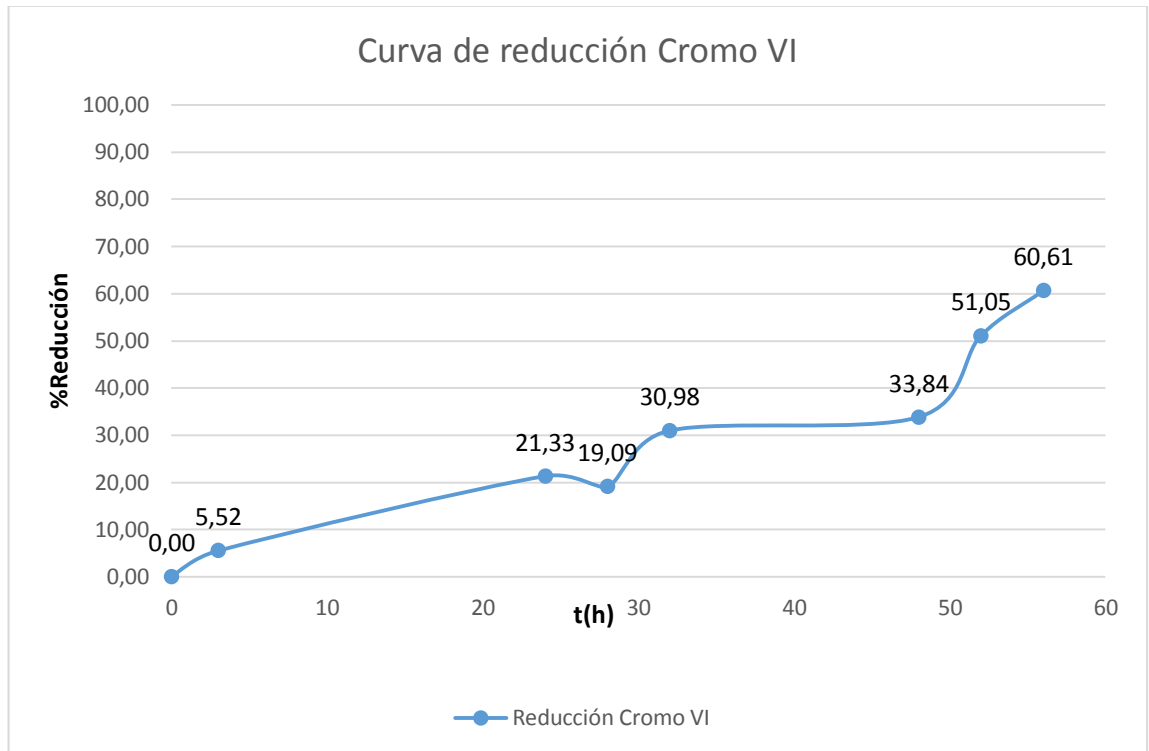


Gráfico 16. Curva de reducción de cromo en agua residual *Pseudomona fluorescens*

5.7.3.1. Control positivo

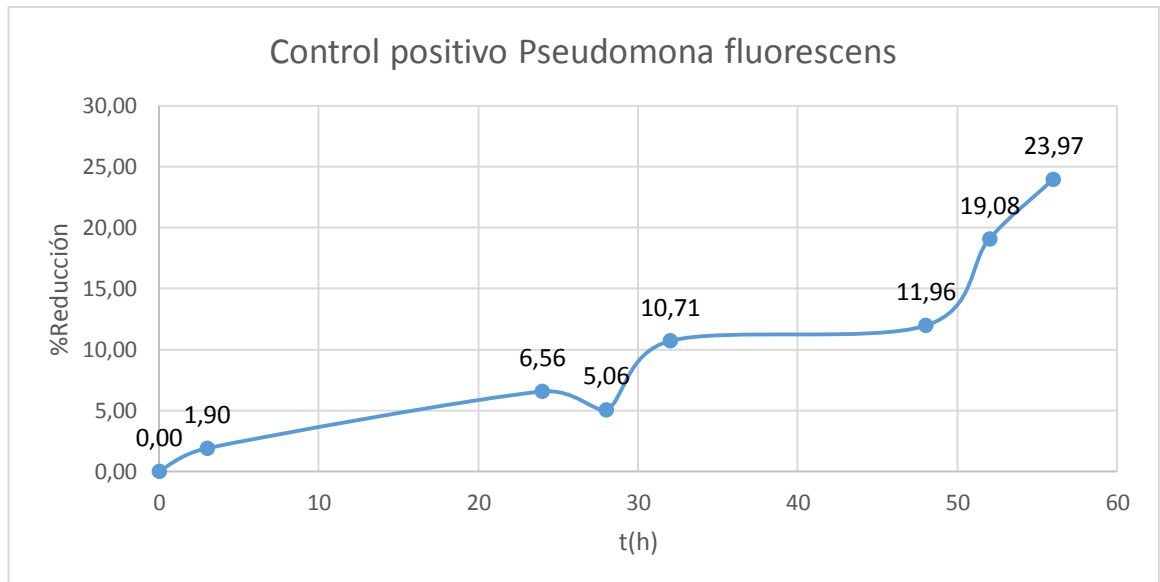


Gráfico 17. Reducción Control positivo *Pseudomona fluorescens*

El porcentaje de reducción de cromo para la bacteria *Pseudomona fluorescens* es del 60.61% con una desviación estándar de ± 7.04 , demostrando ser la bacteria que en promedio de sus tres repeticiones redujo en mayor porcentaje el cromo.

De acuerdo a lo descrito por Beltrán & Gómez (2016, p. 6), “la reducción del cromo VI es llevada a cabo por la enzima cromato reductasa que se encuentra muy bien caracterizada en *Pseudomonas ambigua*”.

Esta cepa fue obtenida del lodo líquido residual, por lo que se puede decir que es un microorganismo resistente a las condiciones ambientales complicadas, ya que dentro del proceso de curtido existen altas temperaturas, presencia de altas concentraciones de cromo y finalmente el tratamiento del agua residual de dicho proceso que se lo realiza añadiendo cal directamente al agua y dejando sedimentar el lodo el cual contiene el cromo.

Como se aprecia en el Gráfico 17, la bacteria se logró adaptar a las condiciones del agua sintética, siendo un claro ejemplo de la relación entre ambiente contaminado y un metabolismo del contaminante. Martínez (2010), menciona que esta relación se observa en algunas especies de los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, que han sido aislados de ambientes contaminados con hidrocarburos y por lo tanto han adquirido la capacidad de transformarlos en sustancias más simples, caso contrario a las cepas de ambientes no contaminados (Martínez, 2010).

5.7.4. *Pseudomona stutzeri*

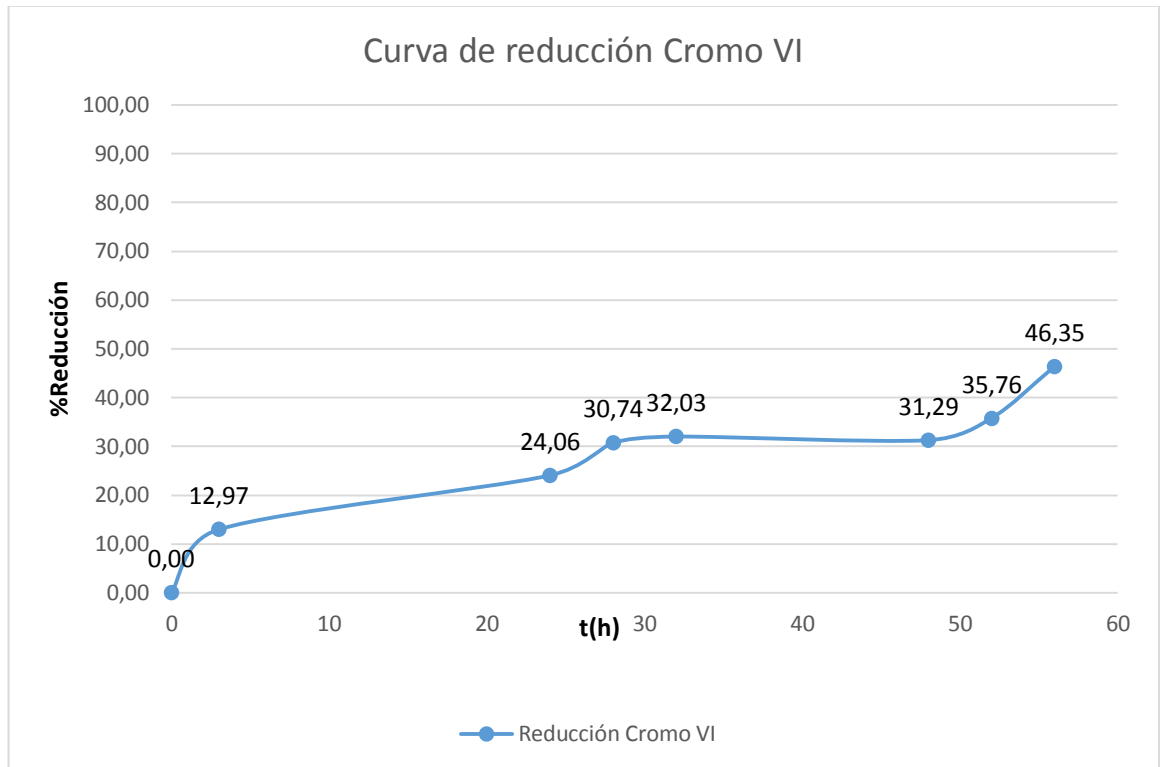


Gráfico 18. Curva de reducción de cromo en agua residual bacteria *Pseudomona stutzeri*

5.7.4.1. Control positivo

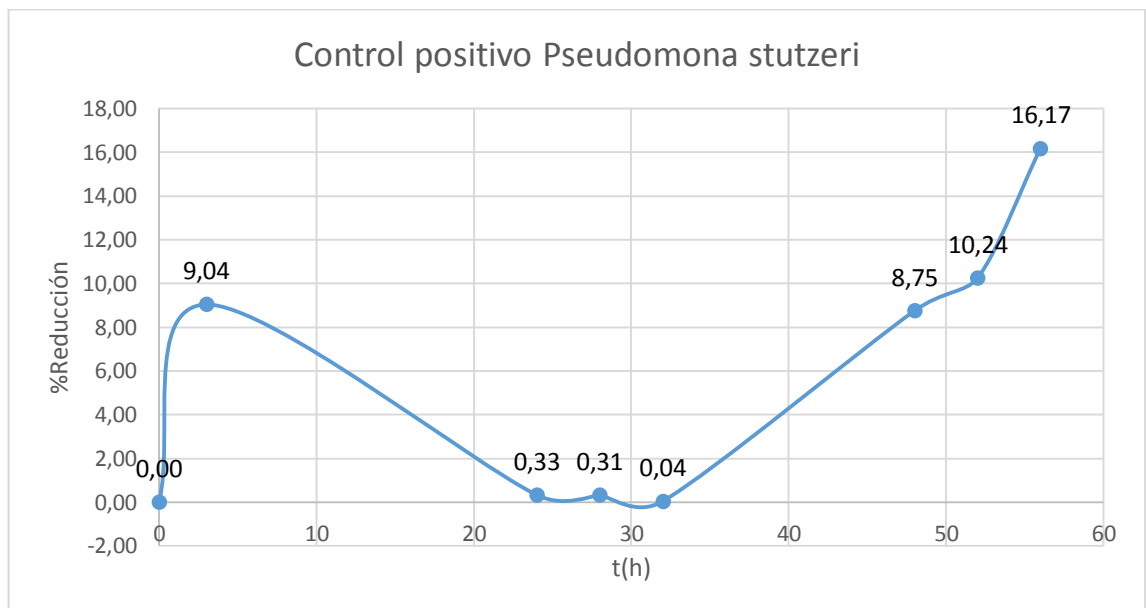


Gráfico 19. Reducción Control positivo *Pseudomona stutzeri*

Como se visualiza en el Gráfico 18, la bacteria *Pseudomona stutzeri* presentó resistencia al cromo, reduciendo del agua residual un 46.35% de cromo en promedio de sus tres repeticiones y con una desviación estándar de ± 5.59 ; tomando en referencia al análisis realizado por Dueñas & Quispe (2011), las cepas bacterianas de *Pseudomona stutzeri* y cepas de *Pseudomona fluorescens* presentan resistencia a concentraciones de cromo de 800 $\mu\text{g/mL}$.

Las variaciones significativas de concentración de cromo del experimento se deben a la adición de permanganato de potasio, agente que oxida la reacción, la cual al no ser detenida a tiempo continua oxidando el cromo reducido por la bacteria alterando los primeros datos.

Se debe mencionar que en general el género *Pseudomona* obtuvo una mejor eficiencia en la reducción de cromo (VI) y al momento de comparar con el género *Hafnia*, las *Pseudomonas* si son una alternativa a considerar para el tratamiento del agua residual, esto lo afirman en otro experimento similar realizado por Guerrero Ceballos et al. (2017), y comprueban que su bacteria analizada (*Bacillus thuringiensis*) presentó alta eficacia en la reducción de cromo hexavalente en el momento de ser implementada en un tratamiento a escala de laboratorio de agua residual sin esterilizar, comparada con técnicas fisicoquímicas convencionales no tan efectivas para la reducción del metal.

5.8. Resumen Crecimiento Bacteriano

Tabla 17

Resumen Crecimiento

Crecimiento Bacteriano

Cepa		<i>Hafnia alvei</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Pseudomona fluorescens</i>	<i>Pseudomona stutzeri</i>
Muestra	K	0.002042	0.00325	0.00538	0.00328
	g	0			
	n	0.0811	0.08156	0.129	0.1069
Residual	K	550.87	347.849	192.7	403.47
	g	719.753	2072.593	212.142	1880.095
	n	0.08	0.03	0.26	0.03
Control Positivo	K	0.001	0.0005	0.005	0.001
	g	719.753	2072.593	212.142	1880.095
	n	0.08	0.03	0.26	0.03

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

La Tabla 17 muestra la cinética del crecimiento bacteriano, en donde, en promedio el número de generaciones (n), velocidad de crecimiento (k) y el tiempo de generación (g), predominó, en los experimentos realizados con la muestra residual, la bacteria *Pseudomona fluorescens* siendo así el microorganismo que necesita menor tiempo para duplicarse, con un mayor número de generaciones.

Para el control positivo preparado únicamente con dicromato de potasio la cepa con mayor crecimiento fue *Pseudomona fluorescens* con valores muy elevados en todos los parámetros de la cinética bacteriana. Cabe mencionar que los controles positivos comprueban la resistencia de las bacterias para desarrollarse en medio con presencia de cromo (VI), estos no poseen las demás características del agua proveniente del proceso de curtido, lo cual refleja la variación en la cinética microbiana.

5.9. Resumen Reducción de Cromo VI

Tabla 18

Resumen Reducción cromo (VI)

Bacteria	pH	Temp. Lab. °C	Temp. cultivo °C	Turbidez NTU	Colonias UFC/mL	cromo mg/L	Reducción %
<i>Hafnia alvei</i>	3.30	18.63	17.88	1.78	32685149.84	1640.4	26.29
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3.33	18.63	17.84	2.56	34157281.92	1243.02	46.35
<i>Pseudomona fluorescens</i>	3.33	18.63	17.70	2.75	34533466.95	994.49	60.61
<i>Pseudomona stutzeri</i>	3.29	18.63	17.65	2.47	34000604.44	1606.72	46.55

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019. 3

En la Tabla 18 se encuentra detallado en promedio de todos los valores que fueron obtenidos en el experimento y se puede observar que la mayor turbidez y por ende colonias bacterianas se encontraron en la bacteria identificada como *Pseudomona fluorescens*, además de ser la que mayor porcentaje de reducción en promedio tiene (60,61%). La segunda bacteria más eficaz fue *Pseudomona stutzeri* (46.55%), seguida de *Acinetobacter lwoffii* (46.35%). En promedio el cultivo que tuvo una temperatura interna superior fue la bacteria identificada como *Hafnia alvei*, sin embargo, fue el microorganismo menos eficaz para la insolubilización de cromo con un porcentaje máximo de reducción de 26.29%.

5.10. Tratamiento estadístico de los datos

Se realizó las pruebas estadísticas en el programa SPSS versión Statics y en el programa RStudio versión 3.5.1, en donde se efectuó el análisis de varianza, el cual demuestra al ser aceptada la hipótesis nula, que las medias de dos o más poblaciones son iguales con respecto a la variable dependiente de estudio. Posteriormente la prueba de Tukey nos permite corroborar en que grupos se genera la variación de las medias. Además, el diagrama de caja y bigotes, representa los valores mínimos, máximos y la mediana de cada grupo. Todo esto se encuentra expresado en los siguientes literales:

5.10.1. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk en RStudio y se tiene el resultado expresado en la siguiente tabla:

Tabla 19

Prueba de normalidad Shapiro-Wilk

Prueba de normalidad Shapiro-Wilk		
Variable dependiente: % Reducción		
	W	Valor p
Bacteria	0.93477	0.4335

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

El valor de W en la Tabla 19 de 0.94377 revela que los datos se encuentran en una distribución normal, permitiendo ajustar los datos a un modelo de análisis de varianza.

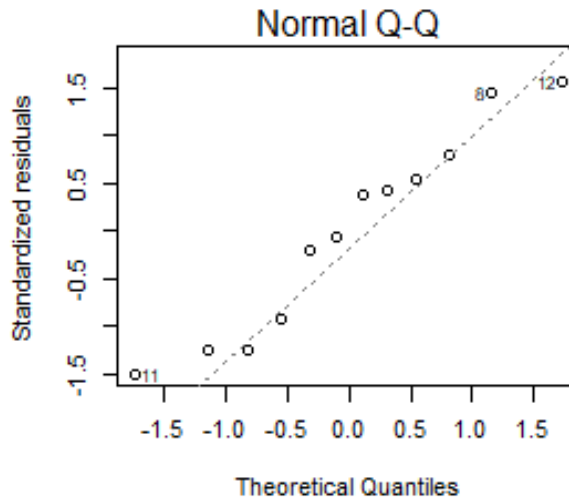


Gráfico 20. Distribución de los datos

5.10.2. ANOVA

Tabla 20

Análisis de Varianza (ANOVA)

ANOVA						
Variable dependiente: % Reducción						
Origen		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	Hipótesis	20032.763	1	20032.763	576.25	1.00E-04
	Error	992.994	28.564	34.764		
Bacteria	Hipótesis	1812.61	3	604.20	14.958	1.21E-03
	Error	323.15	8	40.39		
Repetición	Hipótesis	345.847	6	57.641	2.984	1.99E-01
	Error	57.941	3	19.314		
Tiempo	Hipótesis	2460.507	5	492.101	25.479	1.20E-02

Error	57.941	3	19.314
-------	--------	---	--------

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

La Tabla 20 resumen del ANOVA contiene información de los efectos individuales de las variables incluidas con respecto al porcentaje de reducción de cromo en el modelo: Bacteria, Repeticiones y Tiempo. La significancia indica que mientras las Repeticiones tienen cantidades medias de reducción de cromo que no parecen diferir (Significancia > 0.05), las cantidades medias de reducción de cromo en la variable bacterias y tiempo, así como su intersección se consideran significativamente diferentes (Significancia < 0.05).

5.10.3. Prueba de Tukey

Tabla 21

Prueba de Tukey

% REMOCION			
HSD Tukey _{a,b}			
BACTERIA	N	Subconjunto	
		1	2
<i>Hafnia alvei</i>	24	26.29	
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	24		46.56
<i>Pseudomona fluorescens</i>	24		60.61
<i>Pseudomona stutzeri</i>	24		47.97

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

Se puede observar en la Tabla 21 que para la variable independiente bacterias, la variación de las medias con respecto al porcentaje de reducción de cromo se da en dos grupos claramente definidos en los que consta la cepa *Hafnia alvei* como el grupo con menos media de reducción del metal en estudio, mientras que el grupo conformado por *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomona stutzeri* y *Pseudomona fluorescens* posee los mayores valores de media de reducción. Estos dos grupos se encuentran expresados en el siguiente gráfico donde el nivel de confianza es del 95%:

5.10.4. Diagrama de caja y bigotes

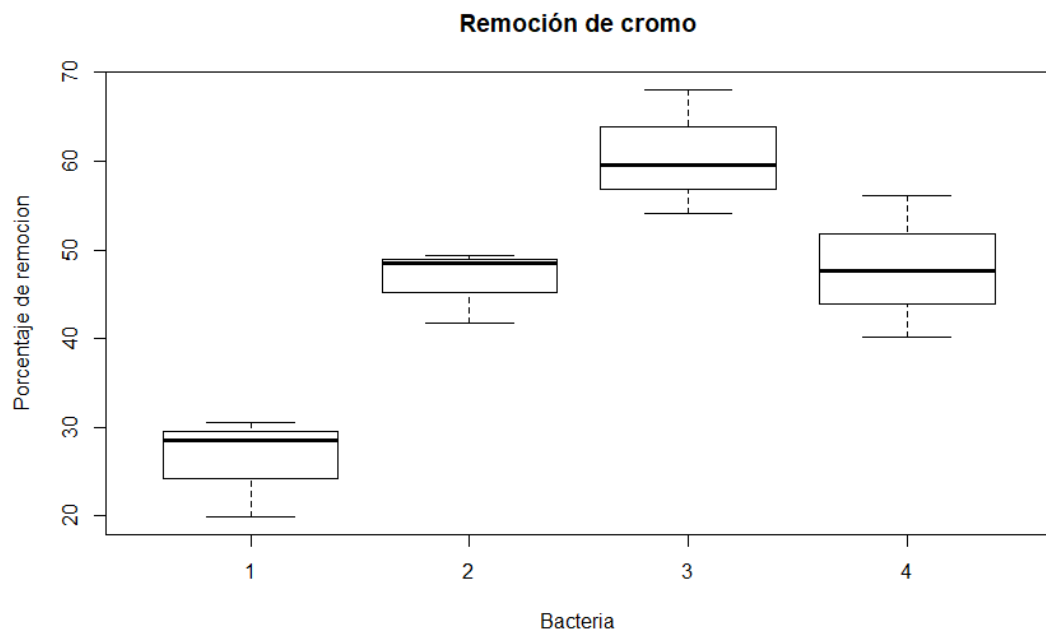


Gráfico 21. Diagrama de caja y bigotes Bacterias vs Porcentaje de Reducción

El Gráfico 21 muestra el comportamiento de los datos, que difieren por bacteria siendo el valor máximo de reducción de cromo entre cepas, encontrado en el microorganismo *Pseudomona fluorescens* con una mediana de 60.61; la bacteria

Pseudomona stutzeri con un valor máximo de reducción correspondiente a 56.08 muestra una mediana de 47.98. En el caso de la bacteria *Acinetobacter lwoffii* mantiene una reducción máxima de 49.31, siendo que el valor de su mediana es 46.55, inferior a las dos bacterias anteriormente mencionadas.

Hafnia alvei muestra en su distribución, el menor valor de reducción de cromo con una mediana de 26.29; siendo la menos eficiente entre las cuatro bacterias estudiadas.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

Haciendo referencia a los resultados obtenidos en el presente documento, se logró determinar todas las características físico-químicas del agua residual y lodos resultantes de la etapa de curtido. Los resultados principales de la caracterización fue en promedio la siguiente: 82.39 g/L de sólidos totales en el agua, 73.53 g/L de sólidos fijos, 9.98 g/L de sólidos volátiles, pH agua residual 3.02, Turbidez 1.42 NTU, una DQO de 3800 mg/L y DBO promedio de 75.89 mg/L. También se debe resaltar el color azul del agua, de acuerdo al análisis la coloración del agua fue muy alto (mayor a 500 PCU).

De acuerdo a las diferentes pruebas realizadas a los microorganismos aislados con la ayuda del kit Microgen GN ID A+B, tiras OxiStrips y prueba en Medio SIM de Hardy Diagnostics se pudo obtener con altas probabilidades el género y especie de cada uno, resultando 4 organismos diferentes. Las primeras dos bacterias identificadas son *Hafnia alvei* y *Acinetobacter lwoffii*, la primera mencionada se determinó como la menos efectiva en el experimento realizado, pero similar a las otras bacterias analizadas *Hafnia alvei* demostró tolerancia a la contaminación con cromo (III) y cromo (VI).

También se logró identificar 2 microorganismos del género *Pseudomona* (*fluorescens* y *stutzeri*), a través de los cuales se pudo demostrar que este género de bacterias son resistentes a las condiciones ambientales extremas de la etapa de curtido incluido el tratamiento in situ. La bacteria *Pseudomona fluorescens* fue la que más efectivamente redujo el cromo en el agua residual, como parte de la discusión se puede observar que otros autores han experimentado con esta bacteria por lo que se

concluye su efectividad en la reducción del cromo presente en agua del proceso de curtido.

Con el análisis de los datos obtenidos en el experimento junto con sus controles positivos y negativos se puede apreciar los valores máximos y mínimos de insolubilización del cromo y estos se reflejan en la bacteria *Pseudomona fluorescens* con un valor máximo de $60.61\% \pm 7.04\%$; seguido de la bacteria *Pseudomona stutzeri* con un valor máximo de $46.35\% \pm 5.59\%$; en tercer lugar con un porcentaje de reducción del $46,55\% \pm 4,13\%$ la bacteria *Acinetobacter lwoffii*, y se encontró el valor mínimo en la bacteria *Hafnia alvei* con un $26.29\% \pm 5.65\%$ de reducción en la duración total del experimento.

Se determinó el cumplimiento de la hipótesis planteada la cual afirmaba que los microorganismos presentes en el agua residual y lodos residuales del proceso de curtido son resistentes a altas concentraciones de metales pesados y pueden insolubilizar el cromo presente en el agua residual de curtido.

6.2.Recomendaciones

Como se observa en la presente investigación las bacterias identificadas presentaron eficiencia en la reducción del cromo en agua residual de curtido por lo cual se recomienda realizar estudios similares para evaluar el potencial que tienen las bacterias en otras condiciones y con otro tipo de contaminación.

Para finalizar se recomienda continuar la investigación en el campo de la biorremediación a este metal pesado tan nocivo como lo es el cromo, para de esta manera promover el uso de tratamientos biológicos que son eficientes y relativamente fáciles de desarrollar, evitando el uso de tecnologías costosas y que afectan los recursos naturales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acebo-González, D., & Hernández-García, A. T. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. In *Revista CENIC Ciencias Biológicas* (Vol. 44). Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181226886003.pdf>
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2012). *RESUMEN DE SALUD PÚBLICA Cromo*. Retrieved from https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs7.pdf
- APHA. (2005). Standard methods for the examination of water and waste water. In *American Public Health Association* (Vol. 7). [https://doi.org/10.1016/0022-2852\(61\)90347-2](https://doi.org/10.1016/0022-2852(61)90347-2)
- Arroyo, M., & Rogel, J. M. (2012). *Aplicación De Sistemas De Biorremediación de suelos y aguas contaminadas por Hidrocarburos*. 2012. Retrieved from http://aguas.igme.es/igme/publica/con_recu_acuiferos/028.pdf
- Barrero, L. (2016). *Microbiología clínica*. Retrieved from <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>
- Beltrán, M., & Gómez, A. (2016). *BIORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS CADMIO (Cd), CROMO (Cr) Y MERCURIO (Hg) MECANISMOS BIOQUÍMICOS E INGENIERÍA GENÉTICA : UNA REVISIÓN*. (Cd), 172–197. Retrieved from <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/download/2027/1835>
- Bonilla, J. P. (2013). Importancia biotecnológica de la biodiversidad. Los nuevos cazadores de microbios. *Julio-Diciembre*, 4(2), 284–317. Retrieved

from <http://www.rvcta.org>

Brutti, L., Beltrán, M., & Garcia de Salomone, I. (2018). *Biorremediación de los Recursos Naturales*. Retrieved from https://inta.gob.ar/sites/default/files/biorremediacion_de_los_recursos_naturales.pdf

Cervantes, Espino-Saldaña, A., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I., Rivera Cano, M., Avila-Rodríguez, M., ... Moreno-Sánchez, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de MICROBIOLOGÍA*, 48, 8. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062v.pdf>

Chafla, P. (2011). *Estudio de un sistema físico-químico a escala prototipo de tratamiento de aguas residuales provenientes de una curtiembre*. Retrieved from <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/1248>

Córdova, H., & et.al. (2014). Tratamiento De Las Aguas Residuales Del Proceso De Curtido Tradicional Y Alternativo Que Utiliza Acomplejantes De Cromo. *Rev Soc Quím Perú*, 80(3), 183–191. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v80n3/a05v80n3.pdf>

Córdova, H., Vargas, R., Téllez, L., Cesare, M., Becker, R., & Figueroa, L. (2013). Influencia del uso de Acomplejantes en el Baño de Curtido Sobre La Calidad Final Del Cuero. *Rev Soc Quím Perú*, 79(4), 388–397. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000400010

Cortón, E., & Viale, A. (2006). Solucionando grandes problemas ambientales con la

ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación. *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*, 3, 6.
<https://doi.org/10.7818/RE.2014.15-3.00>

Dos Santos, A. (2007). Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA FACULTAD DE VETERINARIA DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL Y DE LOS ALIMENTOS).
https://doi.org/10.1057/9780230616202_1

Dueñas, C., & Quispe, F. (2011). *RESISTENCIA A METALES PESADOS Y ANTIBIÓTICOS DE Pseudomonas spp. AISLADAS DE LOS RIOS SALADO Y CAÑIPIA, ESPINAR-CUSCO*. 163. Retrieved from <http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/UNSAAC/860/253T20110014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Fernández, A., García, C., Sáez, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Vol. 29, pp. 601–608.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

Fiallos, J. (2017). Determinación de la correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en placa en el Crecimiento de *Escherichia coli* (Vol. 91). Retrieved from http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26334/1/BQ_135.pdf

Garnacho, J. (2004). *Tratamiento antibiótico de las infecciones graves por Acinetobacter spp.* 4, 1–9. Retrieved from <https://remi.uninet.edu/2004/06/REMIC04i.htm>

Guerrero Ceballos, D. L., Pinta Melo, J., Fernandez Izquierdo, P., Iburguen Mondragón, E., Hidalgo Bonilla, S. P., & Burbano Rosero, E. M. (2017). Eficiencia en la reducción de Cromo por una bacteria silvestre en un tratamiento tipo Batch utilizando como sustrato agua residual del municipio de Pasto, Colombia. *Universidad y Salud*, 19(1), 102. <https://doi.org/10.22267/rus.171901.74>

Guerrero, L., Serna, E., Cardona Gallo, S., Cadavid-Restrepo, G., Suárez, C., & Quintero-Rendón, L. (2014). Consorcio microbiano nativo con actividad catalítica para remoción de índigo y surfactantes en agua residual industrial textil a través de una matriz de inmovilización. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 177. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n1.33172>

Hanna Instruments. (2019). *Hi 83200 Fotómetro Multiparamétrico de Sobremesa para Laboratorios*. Retrieved from http://www.infoagro.com/instrumentos_medida/instrucciones/instrucciones_fotometro_multiparametrico_analisis_aguas_hi83200.pdf

Jeong, E., Schlegel, H., Ho, G., & Ho, S. L. (2004). Nucleotide sequence and expression of the ncr nickel and cobalt resistance in *Hafnia alvei* 5-5. *International Microbiology*, 7(1), 27–34. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15179604>

Johnson, P., & Besselsen, D. (2018). Practical Aspects of Experimental Design in Animal Research Experimental Design : Initial Steps. *Institute for Laboratory Animal Research*, 43(4). Retrieved from <https://web.archive.org/web/20100529013304/http://www.montana.edu/wwwar>

c/Micro 501/ILAR practical exp design.pdf

Laguna, D., & Manrique, C. (2014). *Tratamiento de las aguas residuales del proceso de teñido del cuero en bombo por electrocoagulación-sector de San Benito.*

Retrieved from

<https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/2722/Manriquecamilo2014.pdf?sequence=1>

Las Naciones Unidas Contra La Droga Y El Delito, O. DE. (2012). *Glosario de términos sobre garantía de calidad y buenas prácticas de laboratorio.*

Retrieved from www.unodc.org

Lombeida, L. (2017). *Diseño de una Planta De Tratamiento De Aguas Residuales para una empresa de Curtiembre* (Universidad Central del Ecuador; Vol. 91).

Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9724/1/T-UCE-0008-Q001-2017.pdf>

Londoño, L. F., Londoño, P. T., & Muñoz, F. G. (2016). Los Riesgos De Los Metales Pesados En La Salud Humana Y Animal. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145.

[https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153)

Madigan, M. T., Guerrero, R., Chica Rueda, M. C., Duro, R., Piqueras, M., & Barrachina, C. (2015). *Brock biología de los microorganismos* (14th ed.). Madrid: Pearson Educación.

Martínez. (2010). *PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE ORIGEN MICROBIANO, UTILIZANDO COMO SUSTRATO AGUAS RESIDUALES.* TESIS. Retrieved from

<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/492/1/185421.pdf>

Martínez, F. (2007). *Tratamiento de aguas residuales industriales*. 252. Retrieved from https://www.belzona.com/es/solution_maps/wastewater/money_map.pdf

Masabanda, M., Echegaray, C., Delgado, V., & Echegaray, D. (2017). *Análisis Y Localización De Curtiembres En El Cantón Ambato , Como Parte De Patrimonio Cultural En El*. *II(4)*, 41–56. Retrieved from <http://geo1.espe.edu.ec/wp-content/uploads/2018/01/Art5.pdf>

Matteoda, Blarasin, Damilano, Cabrera, & Albo. (2009). *Cromo en aguas subterráneas y superficiales en el entorno de una curtiembre, relación con valores de fondo natural*. Retrieved from http://aguas.igme.es/Boletin/2009/120_4_2009/11-ARTICULO 9.pdf

Mayz, J. C., & Manzi, L. V. (2017). Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *19(1)*, 29–37. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57408>

Méndez, R. J. (2007). *Producción limpia en la industria de curtiembre*. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=h4h5ZeI3howC&oi=fnd&pg=PA113&dq=flotacion+en+operaciones+unitarias&ots=UPLn1e1Rtr&sig=4NkdqwacxyE0nxSntu2_kHIEKk0#v=onepage&q=flotacion en operaciones unitarias&f=false

Metcalf, & Eddy. (1996). *Ingeniería de aguas residuales*. In *3 Edicion*. Madrid: McGraw-Hill.

- Microgen Bioproducts. (2007). *Microgen TM GN-ID Identificación*. 27. Retrieved from <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12143/MICROGEN-GN-ID-MID64-641-65.%5B2%5D.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Mindlin, S., Petrenko, A., Kurakov, A., Beletsky, A., Mardanov, A., & Petrova, M. (2016). Resistance of Permafrost and Modern *Acinetobacter Iwoffii* Strains to Heavy Metals and Arsenic Revealed by Genome Analysis. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3970831>
- Ministerio del Ambiente. (2013). *Estudios de Potenciales Impactos Ambientales y Vulnerabilidades*. Retrieved from <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/03/PART2.pdf>
- Moeller, G., & Tomasini, A. (2007). *Microbiología De Lodos Activados*. 1–61. Retrieved from <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018834/MEMORIAS2004/CapituloII/5Microbiologiadelodosactivados.pdf>
- Molina, N., Aguilar, P., & Cordovez, C. (2010). Plomo, cromo III y cromo VI y sus efectos sobre la salud humana. *Ciencia & Tecnología Para La Salud Visual y Ocular*, 8(1), 77–88. <https://doi.org/10.19052/SV.831>
- Morocho, M. (2017). *Facultad de Ciencias Agropecuarias APLICACIÓN DOSIFICADA DE EMAs*. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26955/1/Tesis.pdf.pdf>
- Nacheva, P., Armenta, S., Cardoso, L., & Camperos, E. (2005). *Tratamiento De Efluentes Del Proceso De Curtido Al Cromo*. (8532). Retrieved from

https://www.researchgate.net/profile/Petia_Mijaylova/publication/265817134_T RATAMIENTO_DE_EFLUENTES_DEL_PROCESO_DE_CURTIDO_AL_C ROMO/links/579176a308ae0831552f9c37.pdf

Padilla, D., Acosta, F., Ramos-Vivas, J., Grasso, V., Bravo, J., El Aamri, F., & Real, F. (2015). The pathogen *Hafnia alvei* in veterinary medicine: A review. *Journal of Applied Animal Research*, 43(2), 231–235. <https://doi.org/10.1080/09712119.2014.963086>

Pucci, G. N., & Tonin, N. (2010). *Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdova*. 17(2), 237–244. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/262756547_Diversidad_de_bacterias_cultivables_con_capacidad_de_degradar_hidrocarburos_de_la_playa_de_Caleta_Cordova_Argentina

Pulimi, M., Jamwal, S., Samuel, J., & Mukherjee, A. (2012). Enhancing the Hexavalent Chromium Bioremediation Potential of *Acinetobacter junii* VITSUKMW2 Using Statistical Design Experiments. *Article in Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.4014/jmb.1203.03063>

Rivas, A. (2004). *Fundamentos de purificación del agua*. 82–104. Retrieved from <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018834/MEMORIAS2004/CapituloII/2Fundamentosdelapurificaciondelagua.pdf>

Rodr, H. (1981). Medios de cultivo para Microbiología. *Medios De Cultivo Para Microbiología*, 388. Retrieved from https://www.academia.edu/36760263/Medios_de_cultivo_para_microbiología

Satalaya, K. (2014). *IMPACTOS AMBIENTALES GENERADOS POR LA CURTIEMBRE D-LEYSE, EN EL DISTRITO DE EL PORVENIR, PROVINCIA TRUJILLO, REGIÓN LA LIBERTAD*. Retrieved from https://www.unas.edu.pe/web/sites/default/files/web/archivos/actividades_academicas/IMPACTOS AMBIENTALES GENERADOS POR LA CURTIEMBRE D-LEYSE%2C EN EL DISTRITO DE EL PORVENIR%2C PROVINCIA TRUJILLO%2C REGION LA LIBERTAD.pdf

Sathishkumar, Murugan, Benelli, Higuchi, & Rajasekar. (2017). Bioreduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas stutzeri* L1 and *Acinetobacter baumannii* L2. *Annals of Microbiology*, 67(1), 91–98. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1240-4>

Suárez, & Agudelo. (2014). Tratamiento de agua residual procedente de la industria de curtiembres mediante humedales subsuperficiales usando *Zantedeschia aethiopica*. *AVANCES Investigación En Ingeniería*, 11(1), 121–126. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/326283492_Tratamiento_de_agua_residual_procedente_de_la_industria_de_curtiembres_mediante_humedales_subsuperficiales_usando_zantedeschia_aethiopica

Suárez, M. (2013). *GUÍA DE MÉTODOS DE BIORREMEDIACIÓN PARA LA RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS*. 60. Retrieved from [https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/10607/TRABAJO_FINAL cd.pdf?sequence=1](https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/10607/TRABAJO_FINAL_cd.pdf?sequence=1)

Tapia, Freer, Mansilla, Villaseñor, Bruhn, & Basualto. (2002). Estudio de Reducción

Fotocatalizada de cromo hexavalente. *Boletín de La Sociedad Chilena de Química*, 47(4), 469–476. <https://doi.org/10.4067/S0366-16442002000400018>

Tortora, G., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Retrieved from https://www.academia.edu/8408931/Introducción_a_la_Microbiología_9a_EDICIÓN

Vullo, D. L. (2003). INTERACCIÓN EN BENEFICIO DEL MEDIO AMBIENTE. *Química Viva*. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/863/86320303.pdf>

Whitmer, S. (2015). *Cambios en los Nutrientes de las Aguas Residuales Generan Ahorros Para los Dueños de Plantas de Papel*. 1–4. Retrieved from <https://probiotic.com/wp-content/uploads/2016/02/Cambios-en-los-Nutrientes-de-las-Aguas-Residuales-Generan-Ahorros-Para-los-Dueños-de-Plantas-de-Papel.pdf>

Wiley, Sherwood, & Woolverton. (2013). *Microbiología* (7th ed.). Madrid: McGraw-Hill.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1

Pocillo	Reacción	Descripción	Positiva	Negativa
1	Lisina	La Lisina decarboxilasa – al azul de Bromotimol pasa de a 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 ₂ S	Producción de H ₂ S – el Tiosulfato se reduce a H ₂ 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 B-galactosidasa 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	VP	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	Fermentación – el azul de Bromotimol cambia de azul a amarillo como resultado de la producción de ácido por la fermentación de carbohidratos.	Amarillo	Azul
16	Sorbitol			
17	Ramnosa			
18	Sucrosa			
19	Lactosa			
20	Arabinosa			
21	Adonitol			
22	Rafinosa			
23	Salicina			

Figura 2. Tabla de referencia de sustratos

Fuente: (Microgen Bioproducts, 2007)

8.2.Anexo 2



Ilustración 2. Instalaciones curtiduría Serrano

8.3.Anexo 3



Ilustración 3. Equipos del proceso de curtido

8.4.Anexo 4



Ilustración 4. Punto de toma de muestras

Efluente del proceso de curtido y punto de toma de muestras de agua residual y lodos residuales. Elaboración propia, 2018.

8.5.Anexo 5



Ilustración 5. Preparación de viales para prueba DQO

Digestión de las muestras y el blanco a 150 °C por 120 minutos. Elaboración propia, 2018.

8.6. Anexo 6



Ilustración 6. Viales para la determinación de la DQO.

En orden de izquierda a derecha, el Blanco, Vial con 2 mL de agua residual, Vial con dilución del agua 1:10 y Vial con dilución del agua 1:100. Elaboración propia, 2018.

8.7. Anexo 7



Ilustración 7. Digestión de la muestra

Se realiza la digestión de la muestra con ácido nítrico en la campana de extracción hasta reducir el volumen como se aprecia en la ilustración de la derecha. Elaboración propia, 2019.

8.8.Anexo 8



Ilustración 8. Diluciones

Diluciones 1 a 100 a cada una de las soluciones después del proceso de digestión de la muestra. Elaboración propia, 2019.

8.9.Anexo 9



Ilustración 9. Desarrollo del color

Muestra previamente llevada a ebullición con la adición de la solución de permanganato de potasio y posteriormente se añadió la solución de 1,5 difenilcarbazida para el desarrollo del color. Elaboración propia, 2019.

8.10. Anexo 10

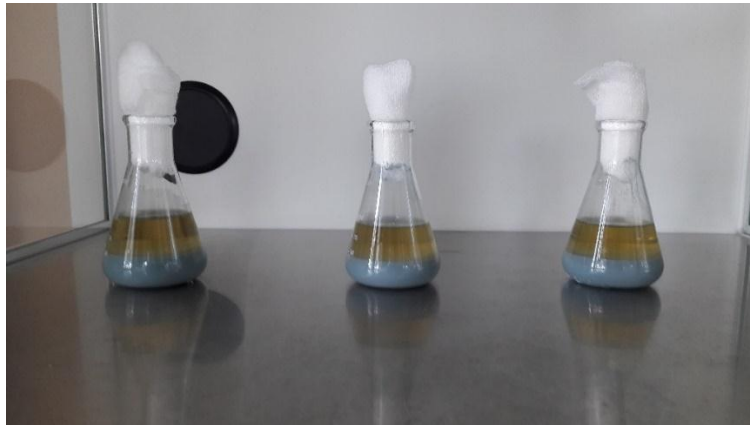


Ilustración 10. Bioestimulación

Adición de 100 mL de lodo residual de la curtiduría en los caldos TSB estériles en una campana de extracción. Elaboración propia, 2018.

8.11. Anexo 11



Ilustración 11. Bioestimulación

Agitación de los caldos TSB con el lodo residual por tres minutos, cada dos días.

Elaboración propia, 2018.

8.12. Anexo 12



Ilustración 12. Primera resiembra de microorganismos en Agar TSA

8.13. Anexo 13



Ilustración 13. Cultivo madre

Cultivo madre de las 5 bacterias aisladas en caldo TSB, incubado por 48 horas.

Elaboración propia, 2019.

8.14. Anexo 14



Ilustración 14. Primera dilución

Dilución 10^{-1} en 99 mL caldo TSB de las 5 bacterias escogidas. Elaboración propia, 2019.

8.15. Anexo 15

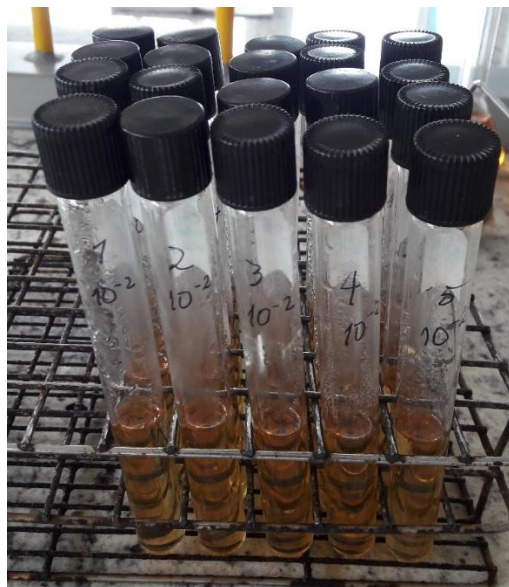


Ilustración 15. Diluciones bacterianas

Dilución de bacterias en caldo TSB y dispuesto en tubos de ensayo, para realizar a continuación la siembra en agar TSA. Elaboración propia, 2019.

8.16. Anexo 16

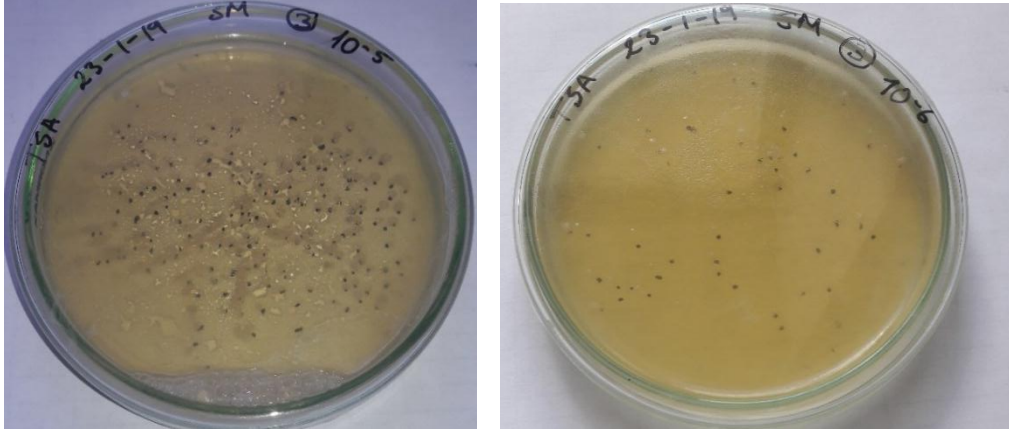


Ilustración 16. Cajas Petri

Dilución y conteo Bacteria *Pseudomona fluorescens*. Elaboración propia, 2019.

8.17. Anexo 17

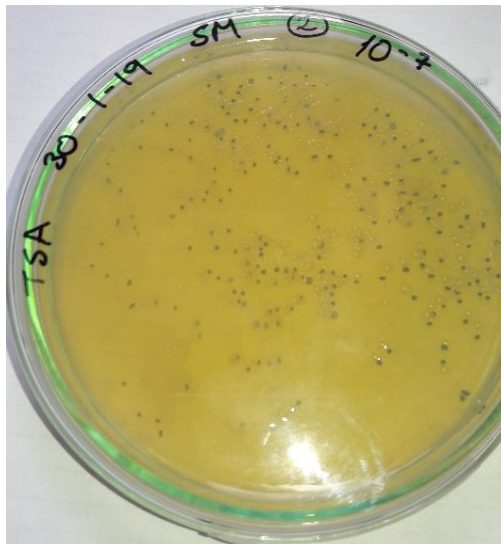


Ilustración 17. Conteo Bacteriano

8.18. Anexo 18

Microgen™ GN A ID

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

Microgen™ GN B ID

WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12
Reaction	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine 24hrs	Arginine 48hrs
Negative	Black	Yellow	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Yellow	Yellow
Positive	Black	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Blue

CAUTION: Keep out of direct sunlight. Due to laminate discoloration and paper ageing, the colours on this chart will change.
These colours are provided as general guide to the range of test colours.

Legends:

- 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

Figura 3. Tabla de colores de sustratos para la identificación microbiana

Fuente: (Microgen Bioproducts, 2007).

8.19. Anexo 19

MICROGEN GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No. 3341 Specimen Type: CHEESE SANDWICH
 Date: 28TH JANUARY 2002

Well Number	GN A wells												GN B wells														
	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatin	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				6			7			6			0			0			7		6			0			

Profile No: 67600760 Final Identification: E. coli

WF6125/01/12

Figura 4. Ejemplo Hoja Resultados

Fuente: (Microgen Bioproducts, 2007).

8.20. Anexo 20

Tabla 22

Datos para curva de calibración McFarland

Estándar No.	Ac. Sulfúrico (1%) mL	Cloruro de Bario mL	Equivalente en UFC/mL ($\times 10^8$)	NTU
1	9.9	0.1	3	72.72
2	9.7	0.3	9	526.16
3	9.5	0.5	15	784.23
4	9.3	0.7	21	1055

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019., 2018

8.21. Anexo 21



Ilustración 18. Estándares McFarland

Estándares preparados para la curva de calibración de McFarland. Elaboración

propia, 2018

8.22. Anexo 22



Ilustración 19. Primer muestreo

En la primera visita in situ se recolectó las siguientes muestras: Agua residual con tratamiento con Poliéster; agua residual con tratamiento con Sulfato de Amonio; Agua resultante del tratamiento in situ y Lodo residual líquido (en papel aluminio).
Elaboración propia, 2018.

8.23. Anexo 23



Ilustración 20. Muestreo y toma de parámetros in situ curtiduría Serrano

8.24. Anexo 24



Ilustración 21. Resultados DBO 5 días

Determinación de la DBO_5 en los equipos Velp Scientifica modelo FL0510100 con diferentes volúmenes de muestra de agua residual. Elaboración propia, 2018.

8.25. Anexo 25

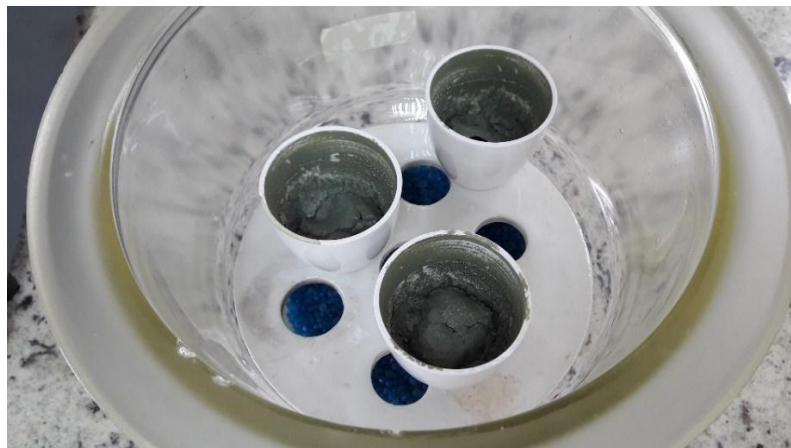


Ilustración 22. Sólidos Fijos

Muestras de 100mL de agua residual a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, posterior calcinación a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos y dispuestas en un desecador. Elaboración propia, 2018.

8.26. Anexo 26



Ilustración 23. Conos Imhoff

Muestras de agua residual en conos Imhoff de un litro de capacidad. Elaboración propia, 2018.

8.27. Anexo 27



Ilustración 24. Cajas Petri

Siembra y aislamiento de bacterias después del segundo muestreo Elaboración propia, 2018.

8.28. Anexo 28



Ilustración 25. Cajas Petri

Siembra y aislamiento de bacterias encontradas en el lodo sólido del segundo muestreo. Elaboración propia, 2018.

8.29. Anexo 29

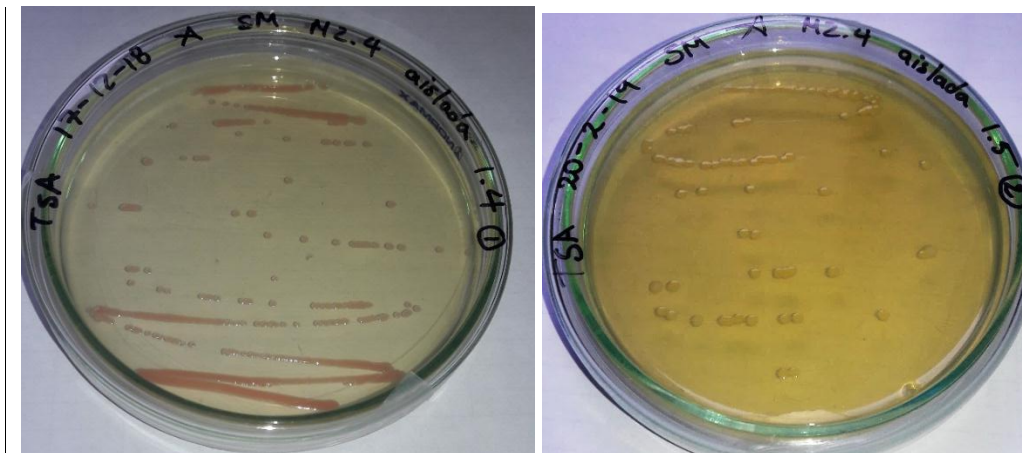


Ilustración 26. Cajas Petri

Siembra y aislamiento de bacterias encontradas en el agua residual del segundo muestreo. Elaboración propia, 2018.

8.30. Anexo 30

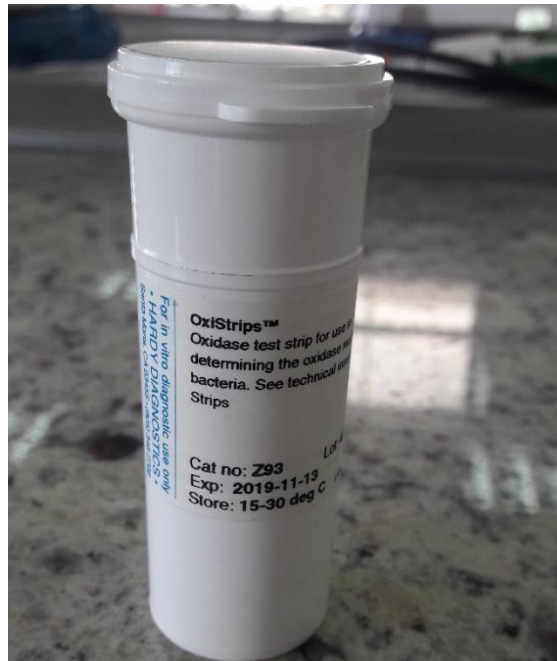


Ilustración 27. OxiStrips

OxiStrips de HARDY Diagnostics para realizar pruebas de Oxidasa a las bacterias escogidas. Elaboración propia, 2019.

8.31. Anexo 31

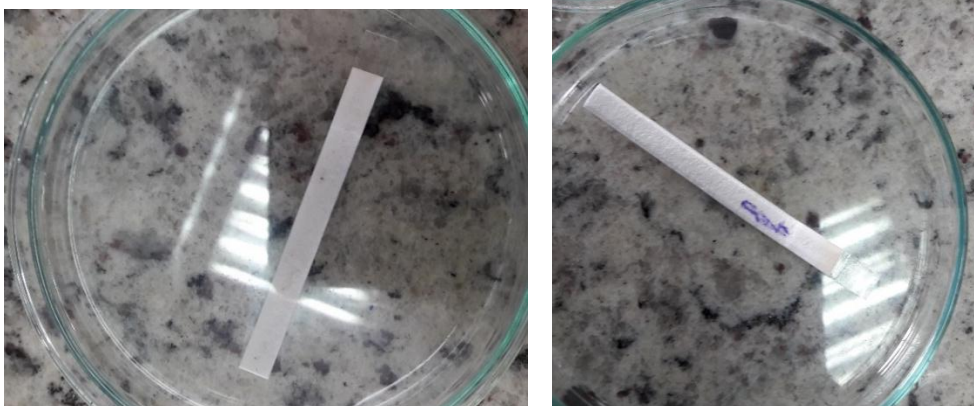


Ilustración 28. Prueba Oxidasa

Prueba de Oxidasa con tiras HARDY Diagnostics en bacterias, resultado negativo y positivo respectivamente. Elaboración propia, 2019.

8.32. Anexo 32



Ilustración 29. Medio SIM

Criterion Medio SIM de HARDY Diagnostics para la diferenciación de Enterobacterias basado en producción de Indol, sulfuro de hidrógeno y Motilidad de las bacterias. Elaboración propia, 2019.

8.33. Anexo 33



Ilustración 30. Interpretación Medio SIM

Bacterias incubadas en agar SIM, la figura de la izquierda revela que las bacterias son no fermentadoras de sulfuro de hidrógeno, mientras que la imagen de la derecha es después de la adición del reactivo de Kovacs dando a resaltar que los microorganismos son Indol negativo. Elaboración propia, 2019.

8.34. Anexo 34



Ilustración 31. Kit Microgen GN ID A+B

Materiales para la identificación microbiana en área estéril. Elaboración propia, 2019.

8.35. Anexo 35

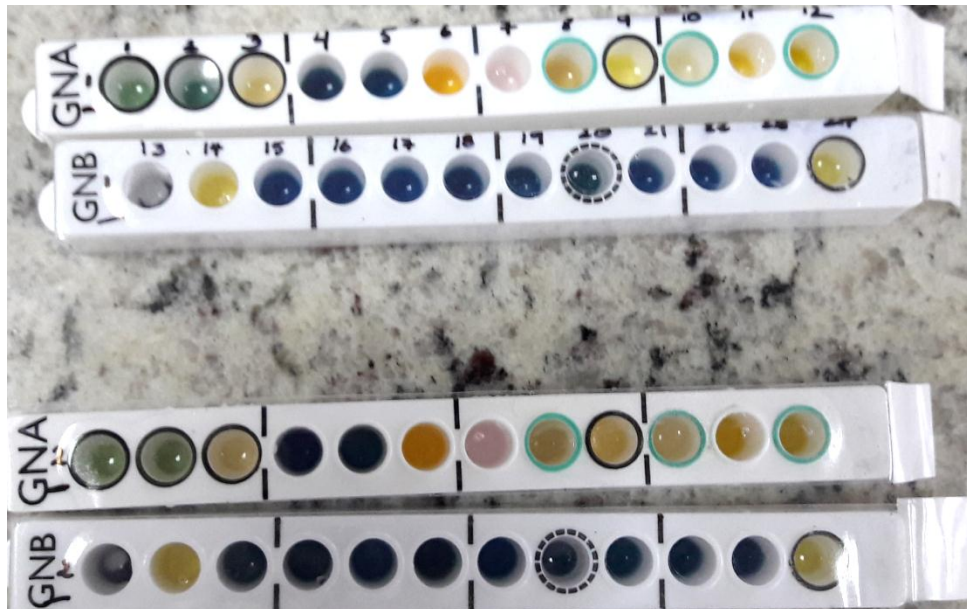


Ilustración 32. GNA+B Oxidasa Negativa

Se incubó el Kit Microgen GNA+B para bacterias oxidasa negativa por 24 horas
Elaboración propia, 2019.

8.36. Anexo 36



Ilustración 33. GNA Oxidasa Positiva.

Se incubó el Kit Microgen GNA para bacterias oxidasa positiva por 48 horas y se
adicionó los reactivos necesarios. Elaboración propia, 2019.

8.37. Anexo 37



Ilustración 34. GNB Oxidasa Positiva

Se incubó el Kit Microgen GNB para bacterias oxidasa positiva por 48 horas y se
tomó lectura de los resultados. Elaboración propia, 2019.

8.38. Anexo 38

**MICROGEN GN-ID A+B PANEL
REPORT FORM**

Lab. No. 1

Specimen Type: Agua Curfido
Date: 5/Abril/2019



Well Number	GN A wells												GN B wells																	
	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine			
Reaction	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
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				6	0			0			0			0			0			0			2							

Profile No: 60000002

Final Identification: Hafnia alvei biogr 1

Ilustración 35. Resultado Identificación Bacteria 1

8.39. Anexo 39

**MICROGEN GN-ID A+B PANEL
REPORT FORM**

Lab. No. 2

Specimen Type: Lodo líquido residual
Date: 5/Abril/2019



Well Number	GN A wells												GN B wells																	
	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine			
Reaction	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
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				4	0			0			0			0			0			0			2							

Profile No: 40000002

Final Identification: Acinetobacter lwoffii

Ilustración 36. Resultado Identificación Bacteria 2

8.40. Anexo 40

**MICROGEN GN-ID A+B PANEL
REPORT FORM**

Lab. No. 3

Specimen Type: Lodo líquido residual
Date: 6/Abril/2019



Well Number	GN A wells												GN B wells																	
	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			
Reaction	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
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	7			4			0			0			0			0			2			1			1					

Profile No: 740000021

Final Identification: Pseudomonas fluorescens - 35

Ilustración 37. Resultado Identificación Bacteria 3

8.41. Anexo 41

**MICROGEN GN-ID A+B PANEL
REPORT FORM**

Lab. No. 4

Specimen Type: Lodo sólido residual
Date: 6/Abril/2019



Well Number	GN A wells												GN B wells																	
	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			
Reaction	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
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	7			4			0			0			0			0			0			1			1					

Profile No: 740000001

Final Identification: Pseudomonas stutzeri

Ilustración 38. Resultado Identificación Bacteria 4

8.42. Anexo 42

MICROGEN GN-ID A+B PANEL REPORT FORM



Lab. No. 5

Specimen Type: lodo sólido residual

Date: 6/Abril/2019

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	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatin	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	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				7			4			0			0			0			0			0			0			1			

Profile No: 7400000L

Final Identification: Pseudomonas stutzeri

Ilustración 39. Resultado Identificación Bacteria 5

8.43. Anexo 43

Microgen ID					
Microgen GNA+ B Oxidase Negative					
Specimen Details					
<i>Lab Ref.:</i> Microbiología			<i>Date:</i> 5/4/2019		
<i>Name:</i> Bacteria aislada 1					
<i>Specimen Type:</i> Agua de curtido					
<i>Source (ward/location):</i> Ambato					
Results Entry					
<i>Octal Code:</i> 60000002					
+ LYS Lysine Decarboxylase	+ ORN Ornithine Decarboxylase	- H2S H2S Production			
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose			
- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis			
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase			
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Utilization	- INO Acid from Inositol			
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose			
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol			
- RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase			
Identification Analysis					
	<i>H.alvei biogp 1</i>	<i>O.proteus biogp 2</i>	<i>E.ictaluri</i>	<i>A.hwoffii</i>	<i>A.haemolyticus</i>
<i>Select ID Choice</i>	Yes	No	No	No	No
<i>Probability</i>	1/79.071	1/1.412.058	1/1.571.127	1/2.969.845	1/3.067.752
<i>Percent Probability</i>	86,29%	4,83%	4,34%	2,3%	2,22%
<i>Likelihood</i>	0,03%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
<i>Human Isolate</i>	Yes	No	Yes	Yes	Yes
<i>Tests against</i>					
<i>Test 1</i>	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	ORN (0,1%)	ORN (0,1%)
<i>Test 2</i>		SAL (0,1%)	SAL (0,1%)	SAL (0,1%)	SAL (0,1%)
<i>Test 3</i>					
<i>Additional Tests</i>					
<i>Acid from Mannose</i>	99,9%	85%	99,9%	0%	0%
<i>Methyl Red</i>	85%	15%	0,1%	0%	0%
<i>Acid from Trehalose</i>	70%	85%	0,1%	0%	0%
<i>Additional Comments</i>					
			11	2	3
	2 Glucose negative, non haemolytic Acinetobacter sp, perform nitrate(-) and motility(-)				
	3 Glucose negative, haemolytic Acinetobacter sp, perform nitrate(-) and motility(-)				
	11 Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1981) 31 : 396-400				
	# Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE				
Identification Comments					
Acceptable Identification of Hafnia alvei biogp 1					
The strain is not typical (multiple tests are against), although it is well separated from other suggested identification choices					
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.					
Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE					

Ilustración 40. Identificación Bacteria 1

8.44. Anexo 44

Microgen ID																																																																																					
Microgen GNA+ B Oxidase Negative																																																																																					
<p>Specimen Details</p> <p><i>Lab Ref.:</i> Microbiologia <i>Date:</i> 5/4/2019 <i>Name:</i> Bacteria Aislada 2 <i>Specimen Type:</i> Lodo líquido Residual <i>Source (ward/location):</i> Ambato</p>																																																																																					
<p>Results Entry</p> <p><i>Octal Code:</i> 4000002</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">+ LYS Lysine Decarboxylase</td> <td style="width: 33%;">- ORN Ornithine Decarboxylase</td> <td style="width: 33%;">- H2S H2S Production</td> </tr> <tr> <td>- GLU Acid from Glucose</td> <td>- MAN Acid from Mannitol</td> <td>- XYL Acid from Xylose</td> </tr> <tr> <td>- ONP ONPG</td> <td>- IND Indole</td> <td>- UR Urea Hydrolysis</td> </tr> <tr> <td>- VP Voges Proskauer</td> <td>- CIT Citrate Utilization</td> <td>- TDA Tryptophan Deaminase</td> </tr> <tr> <td>- GEL Gelatin Liquefaction</td> <td>- MAL Malonate Utilization</td> <td>- INO Acid from Inositol</td> </tr> <tr> <td>- SOR Acid from Sorbitol</td> <td>- RHA Acid from Rhamnose</td> <td>- SUC Acid from Sucrose</td> </tr> <tr> <td>- LAC Acid from Lactose</td> <td>- ARA Acid from Arabinose</td> <td>- ADO Acid from Adonitol</td> </tr> <tr> <td>- RAF Acid from Raffinose</td> <td>+ SAL Acid from Salicin</td> <td>- ARG Arginine Dihydrolase</td> </tr> </table>		+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxylase	- H2S H2S Production	- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose	- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis	- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase	- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Utilization	- INO Acid from Inositol	- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose	- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol	- RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase																																																												
+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxylase	- H2S H2S Production																																																																																			
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose																																																																																			
- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis																																																																																			
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase																																																																																			
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Utilization	- INO Acid from Inositol																																																																																			
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose																																																																																			
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol																																																																																			
- RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase																																																																																			
<p>Identification Analysis</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;"><i>A.lwoffii</i></th> <th style="text-align: center;"><i>A.haemolyticus</i></th> <th style="text-align: center;"><i>H.alvei biogp 1</i></th> <th style="text-align: center;"><i>X.maltophilia</i></th> <th style="text-align: center;"><i>E.ictaluri</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Select ID Choice</i></td> <td style="text-align: center;">Yes</td> <td style="text-align: center;">No</td> <td style="text-align: center;">No</td> <td style="text-align: center;">No</td> <td style="text-align: center;">No</td> </tr> <tr> <td><i>Probability</i></td> <td style="text-align: center;">1/2.973</td> <td style="text-align: center;">1/3.071</td> <td style="text-align: center;">1/64.694</td> <td style="text-align: center;">1/414.312</td> <td style="text-align: center;">1/2.917.808</td> </tr> <tr> <td><i>Percent Probability</i></td> <td style="text-align: center;">49,45%</td> <td style="text-align: center;">47,87%</td> <td style="text-align: center;">2,27%</td> <td style="text-align: center;">0,35%</td> <td style="text-align: center;">0,05%</td> </tr> <tr> <td><i>Likelihood</i></td> <td style="text-align: center;">0,07%</td> <td style="text-align: center;">0,07%</td> <td style="text-align: center;">0,04%</td> <td style="text-align: center;"><0,01%</td> <td style="text-align: center;"><0,01%</td> </tr> <tr> <td><i>Human Isolate</i></td> <td style="text-align: center;">Yes</td> <td style="text-align: center;">Yes</td> <td style="text-align: center;">Yes</td> <td style="text-align: center;">No</td> <td style="text-align: center;">Yes</td> </tr> <tr> <td><i>Tests against</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Test 1</i></td> <td style="text-align: center;">SAL (0,1%)</td> <td style="text-align: center;">SAL (0,1%)</td> <td style="text-align: center;">GLU (99,9%)</td> <td style="text-align: center;">SAL (1%)</td> <td style="text-align: center;">GLU (99,9%)</td> </tr> <tr> <td><i>Test 2</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">CIT (98%)</td> <td style="text-align: center;">SAL (0,1%)</td> </tr> <tr> <td><i>Test 3</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">GEL (89%)</td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Additional Tests</i></td> <td style="text-align: center;">Yes</td> <td style="text-align: center;">Yes</td> <td style="text-align: center;">Yes</td> <td style="text-align: center;">Yes</td> <td style="text-align: center;">Yes</td> </tr> <tr> <td><i>Acid from Mannose</i></td> <td style="text-align: center;">0%</td> <td style="text-align: center;">0%</td> <td style="text-align: center;">99,9%</td> <td style="text-align: center;">0%</td> <td style="text-align: center;">99,9%</td> </tr> <tr> <td><i>Acid from Maltose</i></td> <td style="text-align: center;">0%</td> <td style="text-align: center;">0%</td> <td style="text-align: center;">0,1%</td> <td style="text-align: center;">0%</td> <td style="text-align: center;">99,9%</td> </tr> <tr> <td><i>Additional Comments</i></td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td></td> <td style="text-align: center;">54</td> <td style="text-align: center;">11</td> </tr> </tbody> </table> <p>2 Glucose negative, non haemolytic Acinetobacter sp. perform nitrate(-) and motility(-) 3 Glucose negative, haemolytic Acinetobacter sp. perform nitrate(-) and motility(-) 11 Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1981) 31 : 396-400 54 Previously Pseudomonas maltophilia. Also reported as Stenotrophomonas maltophilia. #. Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE</p>			<i>A.lwoffii</i>	<i>A.haemolyticus</i>	<i>H.alvei biogp 1</i>	<i>X.maltophilia</i>	<i>E.ictaluri</i>	<i>Select ID Choice</i>	Yes	No	No	No	No	<i>Probability</i>	1/2.973	1/3.071	1/64.694	1/414.312	1/2.917.808	<i>Percent Probability</i>	49,45%	47,87%	2,27%	0,35%	0,05%	<i>Likelihood</i>	0,07%	0,07%	0,04%	<0,01%	<0,01%	<i>Human Isolate</i>	Yes	Yes	Yes	No	Yes	<i>Tests against</i>						<i>Test 1</i>	SAL (0,1%)	SAL (0,1%)	GLU (99,9%)	SAL (1%)	GLU (99,9%)	<i>Test 2</i>				CIT (98%)	SAL (0,1%)	<i>Test 3</i>				GEL (89%)		<i>Additional Tests</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	<i>Acid from Mannose</i>	0%	0%	99,9%	0%	99,9%	<i>Acid from Maltose</i>	0%	0%	0,1%	0%	99,9%	<i>Additional Comments</i>	2	3		54	11
	<i>A.lwoffii</i>	<i>A.haemolyticus</i>	<i>H.alvei biogp 1</i>	<i>X.maltophilia</i>	<i>E.ictaluri</i>																																																																																
<i>Select ID Choice</i>	Yes	No	No	No	No																																																																																
<i>Probability</i>	1/2.973	1/3.071	1/64.694	1/414.312	1/2.917.808																																																																																
<i>Percent Probability</i>	49,45%	47,87%	2,27%	0,35%	0,05%																																																																																
<i>Likelihood</i>	0,07%	0,07%	0,04%	<0,01%	<0,01%																																																																																
<i>Human Isolate</i>	Yes	Yes	Yes	No	Yes																																																																																
<i>Tests against</i>																																																																																					
<i>Test 1</i>	SAL (0,1%)	SAL (0,1%)	GLU (99,9%)	SAL (1%)	GLU (99,9%)																																																																																
<i>Test 2</i>				CIT (98%)	SAL (0,1%)																																																																																
<i>Test 3</i>				GEL (89%)																																																																																	
<i>Additional Tests</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes																																																																																
<i>Acid from Mannose</i>	0%	0%	99,9%	0%	99,9%																																																																																
<i>Acid from Maltose</i>	0%	0%	0,1%	0%	99,9%																																																																																
<i>Additional Comments</i>	2	3		54	11																																																																																
<p>Identification Comments</p> <p>Doubtful Identification of Acinetobacter lwoffii The strain is not typical (multiple tests are against), and it is poorly separated from other suggested identification choices ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION. Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE</p>																																																																																					

Ilustración 41. Identificación Bacteria 2

8.45. Anexo 45

Microgen ID																																																																																											
Microgen GNA + B Oxidase Positive																																																																																											
<p>Specimen Details</p> <p><i>Lab Ref.:</i> Microbiología <i>Date:</i> 6/4/2019 <i>Name:</i> Bacteria Aislada 3 <i>Specimen Type:</i> Lodo líquido Residual <i>Source (ward/location):</i> Ambato</p>																																																																																											
<p>Results Entry</p> <p><i>Octal Code:</i> 740000021</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">+ OXI Oxidase</td> <td style="width: 33%;">+ MOT Motility</td> <td style="width: 33%;">+ NIT Nitrate Reduction</td> </tr> <tr> <td>+ LYS Lysine Decarboxylase</td> <td>- ORN Ornithine Decarboxyl</td> <td>- H2S H2S Production</td> </tr> <tr> <td>- GLU Acid from Glucose</td> <td>- MAN Acid from Mannitol</td> <td>- XYL Acid from Xylose</td> </tr> <tr> <td>- ONP ONPG</td> <td>- IND Indole</td> <td>- UR Urea Hydrolysis</td> </tr> <tr> <td>- VP Voges Proskauer</td> <td>- CIT Citrate Utilization</td> <td>- TDA Tryptophan Deaminase</td> </tr> <tr> <td>- GEL Gelatin Liquefaction</td> <td>- MAL Malonate Inhibition</td> <td>- INO Acid from Inositol</td> </tr> <tr> <td>- SOR Acid from Sorbitol</td> <td>- RHA Acid from Rhamnose</td> <td>- SUC Acid from Sucrose</td> </tr> <tr> <td>- LAC Acid from Lactose</td> <td>+ ARA Acid from Arabinose</td> <td>- ADO Acid from Adonitol</td> </tr> <tr> <td>- RAF Acid from Raffinose</td> <td>- SAL Acid from Salicin</td> <td>+ ARG Arginine Dihydrolase</td> </tr> </table>		+ OXI Oxidase	+ MOT Motility	+ NIT Nitrate Reduction	+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production	- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose	- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis	- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase	- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol	- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose	- LAC Acid from Lactose	+ ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol	- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																															
+ OXI Oxidase	+ MOT Motility	+ NIT Nitrate Reduction																																																																																									
+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production																																																																																									
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose																																																																																									
- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis																																																																																									
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase																																																																																									
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol																																																																																									
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose																																																																																									
- LAC Acid from Lactose	+ ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol																																																																																									
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																																									
<p>Identification Analysis</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <thead> <tr> <th></th> <th><i>Ps.fluorescens-35</i></th> <th><i>Ps.stutzeri</i></th> <th><i>V.damsela/ P.damsela</i></th> <th><i>Ps.aeruginosa</i></th> <th><i>V.alginolyticus</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Select ID Choice</i></td> <td>Yes</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> </tr> <tr> <td><i>Probability</i></td> <td>1/7.931</td> <td>1/201.998</td> <td>1/217.350</td> <td>1/406.789</td> <td>1/2.127.578</td> </tr> <tr> <td><i>Percent Probability</i></td> <td>90,68%</td> <td>3,56%</td> <td>3,31%</td> <td>1,77%</td> <td>0,34%</td> </tr> <tr> <td><i>Likelihood</i></td> <td>0,08%</td> <td><0.01%</td> <td><0.01%</td> <td><0.01%</td> <td><0.01%</td> </tr> <tr> <td><i>Human Isolate</i></td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td><i>Tests against</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Test 1</i></td> <td>NIT (5%)</td> <td>ARA (0,1%)</td> <td>GLU (99,9%)</td> <td>CIT (95%)</td> <td>ARG (0,1%)</td> </tr> <tr> <td><i>Test 2</i></td> <td>ARA (7%)</td> <td>ARG (14%)</td> <td>VP (95%)</td> <td>MAL (94%)</td> <td>ARA (10%)</td> </tr> <tr> <td><i>Test 3</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>GLU (85%)</td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Additional Tests</i></td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td><i>Growth in 0% NaCl</i></td> <td>99%</td> <td>96%</td> <td>0,1%</td> <td>99,9%</td> <td>0,1%</td> </tr> <tr> <td><i>Growth on Cetrinide</i></td> <td>80%</td> <td>0,1%</td> <td>0%</td> <td>94%</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td><i>Growth on MacConkey</i></td> <td>99,9%</td> <td>99,9%</td> <td>0%</td> <td>99,9%</td> <td>99,9%</td> </tr> <tr> <td><i>Growth at 42C</i></td> <td>0,1%</td> <td>69%</td> <td>0%</td> <td>99,9%</td> <td>27%</td> </tr> </tbody> </table> <p><i>Additional Comments</i> 12</p> <p style="text-align: center;">12 Int. J. Syst. Bacteriol. (1991) 41:529 - 534</p>			<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>Ps.stutzeri</i>	<i>V.damsela/ P.damsela</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>Select ID Choice</i>	Yes	No	No	No	No	<i>Probability</i>	1/7.931	1/201.998	1/217.350	1/406.789	1/2.127.578	<i>Percent Probability</i>	90,68%	3,56%	3,31%	1,77%	0,34%	<i>Likelihood</i>	0,08%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<i>Human Isolate</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	<i>Tests against</i>						<i>Test 1</i>	NIT (5%)	ARA (0,1%)	GLU (99,9%)	CIT (95%)	ARG (0,1%)	<i>Test 2</i>	ARA (7%)	ARG (14%)	VP (95%)	MAL (94%)	ARA (10%)	<i>Test 3</i>				GLU (85%)		<i>Additional Tests</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	<i>Growth in 0% NaCl</i>	99%	96%	0,1%	99,9%	0,1%	<i>Growth on Cetrinide</i>	80%	0,1%	0%	94%	0%	<i>Growth on MacConkey</i>	99,9%	99,9%	0%	99,9%	99,9%	<i>Growth at 42C</i>	0,1%	69%	0%	99,9%	27%
	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>Ps.stutzeri</i>	<i>V.damsela/ P.damsela</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>V.alginolyticus</i>																																																																																						
<i>Select ID Choice</i>	Yes	No	No	No	No																																																																																						
<i>Probability</i>	1/7.931	1/201.998	1/217.350	1/406.789	1/2.127.578																																																																																						
<i>Percent Probability</i>	90,68%	3,56%	3,31%	1,77%	0,34%																																																																																						
<i>Likelihood</i>	0,08%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%																																																																																						
<i>Human Isolate</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes																																																																																						
<i>Tests against</i>																																																																																											
<i>Test 1</i>	NIT (5%)	ARA (0,1%)	GLU (99,9%)	CIT (95%)	ARG (0,1%)																																																																																						
<i>Test 2</i>	ARA (7%)	ARG (14%)	VP (95%)	MAL (94%)	ARA (10%)																																																																																						
<i>Test 3</i>				GLU (85%)																																																																																							
<i>Additional Tests</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes																																																																																						
<i>Growth in 0% NaCl</i>	99%	96%	0,1%	99,9%	0,1%																																																																																						
<i>Growth on Cetrinide</i>	80%	0,1%	0%	94%	0%																																																																																						
<i>Growth on MacConkey</i>	99,9%	99,9%	0%	99,9%	99,9%																																																																																						
<i>Growth at 42C</i>	0,1%	69%	0%	99,9%	27%																																																																																						
<p>Identification Comments</p> <p>Acceptable Identification of <i>Pseudomonas fluorescens</i> 37°C The strain is not typical (multiple tests are against), although it is well separated from other suggested identification choices ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.</p>																																																																																											

Ilustración 42. Identificación Bacteria 3

8.46. Anexo 46

Microgen ID																																																																																																																			
Microgen GNA + B Oxidase Positive																																																																																																																			
<p>Specimen Details</p> <p><i>Lab Ref.:</i> Microbiología <i>Date:</i> 6/4/2019 <i>Name:</i> Bacteria Aislada 4 <i>Specimen Type:</i> Lodo sólido Residual <i>Source (ward/location):</i> Ambato</p>																																																																																																																			
<p>Results Entry</p> <p><i>Octal Code:</i> 740000001</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">+ OXI Oxidase</td> <td style="width: 33%;">+ MOT Motility</td> <td style="width: 33%;">+ NIT Nitrate Reduction</td> </tr> <tr> <td>+ LYS Lysine Decarboxylase</td> <td>- ORN Ornithine Decarboxyl</td> <td>- H2S H2S Production</td> </tr> <tr> <td>- GLU Acid from Glucose</td> <td>- MAN Acid from Mannitol</td> <td>- XYL Acid from Xylose</td> </tr> <tr> <td>- ONP ONPG</td> <td>- IND Indole</td> <td>- UR Urea Hydrolysis</td> </tr> <tr> <td>- VP Voges Proskauer</td> <td>- CIT Citrate Utilization</td> <td>- TDA Tryptophan Deaminase</td> </tr> <tr> <td>- GEL Gelatin Liquefaction</td> <td>- MAL Malonate Inhibition</td> <td>- INO Acid from Inositol</td> </tr> <tr> <td>- SOR Acid from Sorbitol</td> <td>- RHA Acid from Rhamnose</td> <td>- SUC Acid from Sucrose</td> </tr> <tr> <td>- LAC Acid from Lactose</td> <td>- ARA Acid from Arabinose</td> <td>- ADO Acid from Adonitol</td> </tr> <tr> <td>- RAF Acid from Raffinose</td> <td>- SAL Acid from Salicin</td> <td>+ ARG Arginine Dihydrolase</td> </tr> </table>		+ OXI Oxidase	+ MOT Motility	+ NIT Nitrate Reduction	+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production	- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose	- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis	- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase	- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol	- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose	- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol	- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																																							
+ OXI Oxidase	+ MOT Motility	+ NIT Nitrate Reduction																																																																																																																	
+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production																																																																																																																	
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose																																																																																																																	
- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis																																																																																																																	
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase																																																																																																																	
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol																																																																																																																	
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose																																																																																																																	
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol																																																																																																																	
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																																																																	
<p>Identification Analysis</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <thead> <tr> <th></th> <th><i>Ps.stutzeri</i></th> <th><i>Ps.fluorescens-35</i></th> <th><i>A.xylosoxidans</i></th> <th><i>A.faecalis type 11</i></th> <th><i>Ps.putida</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Select ID Choice</i></td> <td>Yes</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> </tr> <tr> <td><i>Probability</i></td> <td>1/202</td> <td>1/597</td> <td>1/5.778</td> <td>1/47.008</td> <td>1/205.171</td> </tr> <tr> <td><i>Percent Probability</i></td> <td>72,43%</td> <td>24,53%</td> <td>2,53%</td> <td>0,31%</td> <td>0,07%</td> </tr> <tr> <td><i>Likelihood</i></td> <td>5,84%</td> <td>1,09%</td> <td>0,03%</td> <td>0,02%</td> <td><0,01%</td> </tr> <tr> <td><i>Human Isolate</i></td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>No</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td><i>Tests against</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Test 1</i></td> <td>ARG (14%)</td> <td>NIT (5%)</td> <td>ARG (0,1%)</td> <td>ARG (0,1%)</td> <td>NIT (0,1%)</td> </tr> <tr> <td><i>Test 2</i></td> <td></td> <td></td> <td>CIT (80%)</td> <td></td> <td>CIT (95%)</td> </tr> <tr> <td><i>Test 3</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Additional Tests</i></td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td><i>Oxidation of Glucose</i></td> <td>99,9%</td> <td>99,9%</td> <td>0,1%</td> <td>0,1%</td> <td>99,9%</td> </tr> <tr> <td><i>Growth on Cetrinide</i></td> <td>0,1%</td> <td>80%</td> <td>23%</td> <td>12%</td> <td>89%</td> </tr> <tr> <td><i>Growth on SS Agar</i></td> <td>54%</td> <td>86%</td> <td>98%</td> <td>78%</td> <td>99,9%</td> </tr> <tr> <td><i>Growth at 42C</i></td> <td>69%</td> <td>0,1%</td> <td>84%</td> <td>75%</td> <td>0,1%</td> </tr> <tr> <td><i>Growth in 6% NaCl</i></td> <td>80%</td> <td>43%</td> <td>89%</td> <td>54%</td> <td>44%</td> </tr> <tr> <td><i>Additional Comments</i></td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="2">1 Previously Alcaligenes xylosoxidans. Microbiol Immunol (1998) 42: 429 - 438</td> <td colspan="3"></td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="2">2 Previously A.faecalis. Usually isolated from the environment</td> <td colspan="3"></td> </tr> </tbody> </table>			<i>Ps.stutzeri</i>	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.faecalis type 11</i>	<i>Ps.putida</i>	<i>Select ID Choice</i>	Yes	No	No	No	No	<i>Probability</i>	1/202	1/597	1/5.778	1/47.008	1/205.171	<i>Percent Probability</i>	72,43%	24,53%	2,53%	0,31%	0,07%	<i>Likelihood</i>	5,84%	1,09%	0,03%	0,02%	<0,01%	<i>Human Isolate</i>	Yes	Yes	Yes	No	Yes	<i>Tests against</i>						<i>Test 1</i>	ARG (14%)	NIT (5%)	ARG (0,1%)	ARG (0,1%)	NIT (0,1%)	<i>Test 2</i>			CIT (80%)		CIT (95%)	<i>Test 3</i>						<i>Additional Tests</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	<i>Oxidation of Glucose</i>	99,9%	99,9%	0,1%	0,1%	99,9%	<i>Growth on Cetrinide</i>	0,1%	80%	23%	12%	89%	<i>Growth on SS Agar</i>	54%	86%	98%	78%	99,9%	<i>Growth at 42C</i>	69%	0,1%	84%	75%	0,1%	<i>Growth in 6% NaCl</i>	80%	43%	89%	54%	44%	<i>Additional Comments</i>			1	2			1 Previously Alcaligenes xylosoxidans. Microbiol Immunol (1998) 42: 429 - 438						2 Previously A.faecalis. Usually isolated from the environment				
	<i>Ps.stutzeri</i>	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.faecalis type 11</i>	<i>Ps.putida</i>																																																																																																														
<i>Select ID Choice</i>	Yes	No	No	No	No																																																																																																														
<i>Probability</i>	1/202	1/597	1/5.778	1/47.008	1/205.171																																																																																																														
<i>Percent Probability</i>	72,43%	24,53%	2,53%	0,31%	0,07%																																																																																																														
<i>Likelihood</i>	5,84%	1,09%	0,03%	0,02%	<0,01%																																																																																																														
<i>Human Isolate</i>	Yes	Yes	Yes	No	Yes																																																																																																														
<i>Tests against</i>																																																																																																																			
<i>Test 1</i>	ARG (14%)	NIT (5%)	ARG (0,1%)	ARG (0,1%)	NIT (0,1%)																																																																																																														
<i>Test 2</i>			CIT (80%)		CIT (95%)																																																																																																														
<i>Test 3</i>																																																																																																																			
<i>Additional Tests</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes																																																																																																														
<i>Oxidation of Glucose</i>	99,9%	99,9%	0,1%	0,1%	99,9%																																																																																																														
<i>Growth on Cetrinide</i>	0,1%	80%	23%	12%	89%																																																																																																														
<i>Growth on SS Agar</i>	54%	86%	98%	78%	99,9%																																																																																																														
<i>Growth at 42C</i>	69%	0,1%	84%	75%	0,1%																																																																																																														
<i>Growth in 6% NaCl</i>	80%	43%	89%	54%	44%																																																																																																														
<i>Additional Comments</i>			1	2																																																																																																															
	1 Previously Alcaligenes xylosoxidans. Microbiol Immunol (1998) 42: 429 - 438																																																																																																																		
	2 Previously A.faecalis. Usually isolated from the environment																																																																																																																		
<p>Identification Comments</p> <p>Inconclusive Identification of <i>Pseudomonas stutzeri</i> The strain is not typical (one or more tests may be against), and it is moderately well separated from other suggested identification choices ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.</p>																																																																																																																			

Ilustración 43. Identificación bacteria 4

8.47. Anexo 47

Microgen ID																																																																																																																			
Microgen GNA + B Oxidase Positive																																																																																																																			
<p>Specimen Details</p> <p>Lab Ref.: Microbiología Date: 6/4/2019 Name: Bacteria Aislada 4 Specimen Type: Lodo sólido Residual Source (ward/location): Ambato</p>																																																																																																																			
<p>Results Entry</p> <p>Octal Code: 740000001</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">+ OXI Oxidase</td> <td style="width: 33%;">+ MOT Motility</td> <td style="width: 33%;">+ NIT Nitrate Reduction</td> </tr> <tr> <td>+ LYS Lysine Decarboxylase</td> <td>- ORN Ornithine Decarboxyl</td> <td>- H2S H2S Production</td> </tr> <tr> <td>- GLU Acid from Glucose</td> <td>- MAN Acid from Mannitol</td> <td>- XYL Acid from Xylose</td> </tr> <tr> <td>- ONP ONPG</td> <td>- IND Indole</td> <td>- UR Urea Hydrolysis</td> </tr> <tr> <td>- VP Voges Proskauer</td> <td>- CIT Citrate Utilization</td> <td>- TDA Tryptophan Deaminase</td> </tr> <tr> <td>- GEL Gelatin Liquefaction</td> <td>- MAL Malonate Inhibition</td> <td>- INO Acid from Inositol</td> </tr> <tr> <td>- SOR Acid from Sorbitol</td> <td>- RHA Acid from Rhamnose</td> <td>- SUC Acid from Sucrose</td> </tr> <tr> <td>- LAC Acid from Lactose</td> <td>- ARA Acid from Arabinose</td> <td>- ADO Acid from Adonitol</td> </tr> <tr> <td>- RAF Acid from Raffinose</td> <td>- SAL Acid from Salicin</td> <td>+ ARG Arginine Dihydrolase</td> </tr> </table>		+ OXI Oxidase	+ MOT Motility	+ NIT Nitrate Reduction	+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production	- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose	- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis	- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase	- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol	- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose	- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol	- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																																							
+ OXI Oxidase	+ MOT Motility	+ NIT Nitrate Reduction																																																																																																																	
+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production																																																																																																																	
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose																																																																																																																	
- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis																																																																																																																	
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase																																																																																																																	
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol																																																																																																																	
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose																																																																																																																	
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol																																																																																																																	
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																																																																	
<p>Identification Analysis</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <thead> <tr> <th></th> <th><i>Ps.stutzeri</i></th> <th><i>Ps.fluorescens-35</i></th> <th><i>A.xylosoxidans</i></th> <th><i>A.faecalis type 11</i></th> <th><i>Ps.putida</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Select ID Choice</td> <td>Yes</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> </tr> <tr> <td>Probability</td> <td>1/202</td> <td>1/597</td> <td>1/5.778</td> <td>1/47.008</td> <td>1/205.171</td> </tr> <tr> <td>Percent Probability</td> <td>72,43%</td> <td>24,53%</td> <td>2,53%</td> <td>0,31%</td> <td>0,07%</td> </tr> <tr> <td>Likelihood</td> <td>5,84%</td> <td>1,09%</td> <td>0,03%</td> <td>0,02%</td> <td><0.01%</td> </tr> <tr> <td>Human Isolate</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>No</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td>Tests against</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Test 1</td> <td>ARG (14%)</td> <td>NIT (5%)</td> <td>ARG (0,1%)</td> <td>ARG (0,1%)</td> <td>NIT (0,1%)</td> </tr> <tr> <td>Test 2</td> <td></td> <td></td> <td>CIT (80%)</td> <td></td> <td>CIT (95%)</td> </tr> <tr> <td>Test 3</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Additional Tests</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td>Oxidation of Glucose</td> <td>99,9%</td> <td>99,9%</td> <td>0,1%</td> <td>0,1%</td> <td>99,9%</td> </tr> <tr> <td>Growth on Cetrimide</td> <td>0,1%</td> <td>80%</td> <td>23%</td> <td>12%</td> <td>89%</td> </tr> <tr> <td>Growth on SS Agar</td> <td>54%</td> <td>86%</td> <td>98%</td> <td>78%</td> <td>99,9%</td> </tr> <tr> <td>Growth at 42C</td> <td>69%</td> <td>0,1%</td> <td>84%</td> <td>75%</td> <td>0,1%</td> </tr> <tr> <td>Growth in 6% NaCl</td> <td>80%</td> <td>43%</td> <td>89%</td> <td>54%</td> <td>44%</td> </tr> <tr> <td>Additional Comments</td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="5">1 Previously Alcaligenes xylosoxidans. Microbiol Immunol (1998) 42: 429 - 438</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="5">2 Previously A.faecalis. Usually isolated from the environment</td> </tr> </tbody> </table>			<i>Ps.stutzeri</i>	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.faecalis type 11</i>	<i>Ps.putida</i>	Select ID Choice	Yes	No	No	No	No	Probability	1/202	1/597	1/5.778	1/47.008	1/205.171	Percent Probability	72,43%	24,53%	2,53%	0,31%	0,07%	Likelihood	5,84%	1,09%	0,03%	0,02%	<0.01%	Human Isolate	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Tests against						Test 1	ARG (14%)	NIT (5%)	ARG (0,1%)	ARG (0,1%)	NIT (0,1%)	Test 2			CIT (80%)		CIT (95%)	Test 3						Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Oxidation of Glucose	99,9%	99,9%	0,1%	0,1%	99,9%	Growth on Cetrimide	0,1%	80%	23%	12%	89%	Growth on SS Agar	54%	86%	98%	78%	99,9%	Growth at 42C	69%	0,1%	84%	75%	0,1%	Growth in 6% NaCl	80%	43%	89%	54%	44%	Additional Comments			1	2			1 Previously Alcaligenes xylosoxidans. Microbiol Immunol (1998) 42: 429 - 438						2 Previously A.faecalis. Usually isolated from the environment				
	<i>Ps.stutzeri</i>	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.faecalis type 11</i>	<i>Ps.putida</i>																																																																																																														
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No																																																																																																														
Probability	1/202	1/597	1/5.778	1/47.008	1/205.171																																																																																																														
Percent Probability	72,43%	24,53%	2,53%	0,31%	0,07%																																																																																																														
Likelihood	5,84%	1,09%	0,03%	0,02%	<0.01%																																																																																																														
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	No	Yes																																																																																																														
Tests against																																																																																																																			
Test 1	ARG (14%)	NIT (5%)	ARG (0,1%)	ARG (0,1%)	NIT (0,1%)																																																																																																														
Test 2			CIT (80%)		CIT (95%)																																																																																																														
Test 3																																																																																																																			
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes																																																																																																														
Oxidation of Glucose	99,9%	99,9%	0,1%	0,1%	99,9%																																																																																																														
Growth on Cetrimide	0,1%	80%	23%	12%	89%																																																																																																														
Growth on SS Agar	54%	86%	98%	78%	99,9%																																																																																																														
Growth at 42C	69%	0,1%	84%	75%	0,1%																																																																																																														
Growth in 6% NaCl	80%	43%	89%	54%	44%																																																																																																														
Additional Comments			1	2																																																																																																															
	1 Previously Alcaligenes xylosoxidans. Microbiol Immunol (1998) 42: 429 - 438																																																																																																																		
	2 Previously A.faecalis. Usually isolated from the environment																																																																																																																		
<p>Identification Comments</p> <p>Inconclusive Identification of <i>Pseudomonas stutzeri</i> The strain is not typical (one or more tests may be against), and it is moderately well separated from other suggested identification choices ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.</p>																																																																																																																			

Ilustración 44. Identificación bacteria 5

8.48. Anexo 48



Ilustración 45. Control Positivo

En los matraces erlenmeyer se colocó una solución de 2,5 ppm de cromo hexavalente (dicromato de potasio) junto con un cultivo de 48 horas de cada una de las bacterias aisladas, esto representa el control positivo del experimento. Elaboración propia, 2019.

8.49. Anexo 49



Ilustración 46. Control positivo

Se agitaron los controles de dicromato de potasio junto con las bacterias durante 10 minutos antes de cada medición de parámetros físico-químicos. Elaboración propia, 2019.

8.50. Anexo 50



Ilustración 47. Experimento

Matraces erlenmeyer con agua residual de curtiembre con las bacterias aisladas respectivamente en 3 repeticiones. Elaboración propia, 2019.

8.51. Anexo 51

8.51.1. Datos *Hafnia alvei*.

8.51.1.1. *Control positivo.*

Tabla 23

Control positivo Hafnia alvei

Tiempo horas	pH	Temp. Lab. °C	Temp. cultivo °C	Turbidez NTU	Colonias UFC/mL	Log [10]	cromo mg/L
0	7.06	18.3	17.1	0.0	2.93E+07	7.47	2299.96
3	6.81	18.7	16.8	0.0	2.93E+07	7.47	2141.35
6	7.07	18.7	17.4	0.0	2.93E+07	7.47	1924.66

24	6.86	17.6	17.2	0.0	2.93E+07	7.47	1883.09
28	7.17	18.4	17.4	0.0	2.93E+07	7.47	1983.34
32	7.03	19.9	18.4	0.0	2.93E+07	7.47	1863.27
48	6.63	19.5	17.3	0.2	2.97E+07	7.47	1932.9
52	6.74	18.2	17.6	0.5	3.03E+07	7.48	1924.72
56	6.76	18.4	17.4	0.85	3.09E+07	7.49	1861.24

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

8.51.1.1. Experimentos.

Tabla 24

Reducción *Bacteria Hafnia alvei*

Tiempo horas	pH	Temp. Lab. °C	Temp. cultivo °C	Turbidez NTU	Colonias UFC/mL	Log [10]	cromo mg/L
0	3.35±	18.3±	17.73±	1.57±	32270789.59±	7.51±	2247.76±
	0	0	0.06	0.31	591510.7	0.01	470.15
3	3.26±	18.7±	17.87±	1.5±	32137176.31±	7.51±	2108.41±
	0.01	0	0.15	0.46	871435.38	0.01	485
24	3.31±	17.6±	17.3±	1.83±	32767067.51±	7.52±	1724.52±
	0	0	0.1	0.68	1295475.73	0.02	409.52
28	3.3±	18.4±	18.57±	1.55±	32238976.9±	7.51±	1806.63±
	0.02	0	0.23	0.24	454509.67	0.01	373.24
32	3.32±	19.9±	18.23±	1.75±	32627091.68±	7.51±	1710.57±
	0.01	0	0.12	0.36	693837.55	0.01	418.49
48	3.31±	19.5±	17.97±	1.81±	32741617.36±	7.51±	1829.04±

	0.01	0	0.12	0.75	1428683.65	0.02	314.49
52	3.26±	18.2±	17.57±	2.08±	33244257.81±	7.52±	1561.54±
	0.02	0	0.12	0.43	824384.52	0.01	259.45
56	3.27±	18.4±	17.77±	2.19±	33454221.54±	7.52±	1640.4±
	0	0	0.06	0.26	488259.97	0.01	236.04

8.51.2. Datos *Acinetobacter lwoffii*.

8.51.2.1. *Control positivo.*

Tabla 25

Control positivo Acinetobacter lwoffii

Tiempo horas	pH	Temp. Lab. °C	Temp. cultivo °C	Turbidez NTU	Colonias UFC/mL	Log [10]	cromo mg/L
0	7.21	18.3	17.1	0.0	2.93E+07	7.47	2463.3
3	6.34	18.7	17.1	0.0	2.93E+07	7.47	1722.95
6	6.99	18.7	17.3	0.0	2.93E+07	7.47	1950.28
24	6.84	17.6	17.3	0.0	2.93E+07	7.47	1966.88
28	7.12	18.4	17.4	0.0	2.93E+07	7.47	1966.43
32	7.05	19.9	18.3	0.0	2.93E+07	7.47	1856.06
48	6.98	19.5	17.4	0.0	2.93E+07	7.47	2000.71
52	7.01	18.2	17.7	0.2	2.96E+07	7.47	2005.98
56	7.03	18.4	17.4	0.29	2.98E+07	7.47	1725.84

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

8.51.2.2. *Experimentos.*

Tabla 26

Reducción Bacteria Acinetobacter lwoffii

Tiempo horas	pH	Temp. Lab. °C	Temp. cultivo °C	Turbidez NTU	Colonias UFC/mL	Log [10]	cromo mg/L
0	3.38±	18.3±	17.47±	2.3±	33670547.81±	7.53±	2335.21±
	0.04	0	0.12	0.61	1167157.15	0.01	246.64
3	3.29±	18.7±	18±	2.01±	33110644.53±	7.52±	2316.78±
	0.04	0	0.1	0.37	711723.11	0.01	237.89
24	3.34±	17.6±	17.5±	3.26±	35509321.12±	7.55±	1932.91±
	0.02	0	0.1	0.61	1171415.53	0.01	171.82
28	3.35±	18.4±	18.57±	2.58±	34198638.42±	7.53±	1905.53±
	0.03	0	0.15	0.28	539991.66	0.01	127.39
32	3.36±	19.9±	18.33±	2.6±	34249538.72±	7.53±	1775.37±
	0.02	0	0.25	0.31	583448.49	0.01	173.12
48	3.35±	19.5±	17.53±	2.74±	34516765.29±	7.54±	1710.32±
	0.04	0	0.32	0.57	1080151.99	0.01	220.07
52	3.3±	18.2±	17.53±	2.39±	33848698.86±	7.53±	1767.47±
	0.04	0	0.06	0.73	1396181.96	0.02	215.62
56	3.3±	18.4±	17.77±	2.55±	34154100.66±	7.53±	1243.02±
	0.03	0	0.12	0.6	1151021.52	0.01	83.62

8.51.3. Datos Pseudomona fluorescens.

8.51.3.1. Control positivo.

Tabla 27

Control positivo Pseudomona fluorescens

Tiempo horas	pH	Temp. Lab. °C	Temp. cultivo °C	Turbidez NTU	Colonias UFC/mL	Log [10]	cromo mg/L
0	7.08	18.3	16.8	0	29280397	7.466576961	1991.86
3	6.8	18.7	17.2	0	29280397	7.466576961	1954.01
6	6.92	18.7	17.2	0	29280397	7.466576961	1870.45
24	7.03	17.6	17.3	0	29280397	7.466576961	1861.23
28	7.13	18.4	17.8	0.17	29604886	7.471363399	1891.02
32	7.07	19.9	17.2	0.15	29566711	7.470803019	1778.6
48	6.93	19.5	17.6	2.38	33823249	7.529215319	1653.63
52	6.93	18.2	17.8	2.6	34243176	7.53457404	1511.91
56	6.94	18.4	17.6	3.08	35159382	7.546041227	1314.39

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

8.51.3.2. Experimentos.

Tabla 28

Reducción Bacteria Pseudomona fluorescens

Tiempo horas	pH	Temp. Lab. °C	Temp. cultivo °C	Turbidez NTU	Colonias UFC/mL	Log [10]	cromo mg/L
0	3.35±	18.3±	17.27±	2.18±	33435133.93±	7.52±	2560.63±

	0.02	0	0.06	0.64	1212376.45	0.02	303.44
3	3.29±	18.7±	18±	1.91±	32932493.48±	7.52±	2416.37±
	0.04	0	0	0.12	227721.96	0	249.09
24	3.34±	17.6±	17.13±	3.81±	36559139.78±	7.56±	2010.28±
	0.03	0	0.06	0.4	757836.7	0.01	206.02
28	3.34±	18.4±	18.23±	2.58±	34205000.95±	7.53±	2072.14±
	0.03	0	0.12	0.53	1020250.28	0.01	260.36
32	3.34±	19.9±	18.2±	3.19±	35375707.83±	7.55±	1770.48±
	0.03	0	0.17	0.69	1317506.21	0.02	376.55
48	3.35±	19.5±	17.57±	3.06±	35114843.8±	7.55±	1686.69±
	0.03	0	0.06	0.9	1710694.52	0.02	286.93
52	3.32±	18.2±	17.57±	2.63±	34300439.02±	7.54±	1233.2±
	0.04	0	0.12	0.46	887317.37	0.01	145.15
56	3.3±	18.4±	17.6±	2.65±	34344976.78±	7.54±	994.49±
	0.03	0	0.3	0.61	1155444.5	0.01	66.74

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

8.51.4. Datos *Pseudomona stutzeri*.

8.51.4.1. Control positivo.

Tabla 29

Control positivo Pseudomona stutzeri

Tiempo horas	pH	Temp. Lab. °C	Temp. cultivo °C	Turbidez NTU	Colonias UFC/mL	Log [10]	cromo mg/L
0	7.26	18.3	16.7	0.0	2.93E+07	7.47	1980.97
3	6.38	18.7	17.2	0.0	2.93E+07	7.47	1801.93

6	6.95	18.7	17.3	0.0	2.93E+07	7.47	1810.61
24	7.01	17.6	17.3	0.0	2.93E+07	7.47	1974.39
28	7.14	18.4	17.5	0.0	2.93E+07	7.47	1974.9
32	7.05	19.9	18.5	0.0	2.93E+07	7.47	1980.2
48	7.05	19.5	17.7	0.0	2.93E+07	7.47	1807.61
52	7.03	18.2	17.8	0.3	2.98E+07	7.47	1778.02
56	7.02	18.4	17.9	0.32	2.99E+07	7.48	1660.67

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.

8.51.4.2. Experimentos.

Tabla 30

Reducción Bacteria Pseudomona stutzeri

Tiempo horas	pH	Temp. Lab. °C	Temp. cultivo °C	Turbidez NTU	Colonias UFC/mL	Log [10]	cromo mg/L
0	3.31± 0.05	18.3± 0	17.3± 0.1	1.89± 0.35	32887955.72± 675388.66	7.52± 0.01	3020.08± 495.9
3	3.27± 0	18.7± 0	18.1± 0.26	2.16± 0.18	33403321.24± 345163.99	7.52± 0	2614.93± 303.36
24	3.29± 0.01	17.6± 0	17.17± 0.06	2.22± 0.3	33511484.38± 571460.71	7.53± 0.01	2311.63± 561.96
28	3.31± 0.01	18.4± 0	17.93± 0.46	2.79± 0.5	34612203.35± 947932.66	7.54± 0.01	2097.68± 444.26
32	3.28±	19.9±	18.1±	2.87±	34752179.17±	7.54±	2046.21±

	0.01	0	0	0.66	1252579.86	0.02	301.3
48	3.3±	19.5±	17.43±	2.93±	34873067.38±	7.54±	2072.99±
	0.02	0	0.12	0.46	881136.77	0.01	319.77
52	3.27±	18.2±	17.53±	2.23±	33530571.99±	7.53±	1934.1±
	0	0	0.12	0.21	393192.46	0.01	264.53
56	3.26±	18.4±	17.63±	2.7±	34434052.3±	7.54±	1606.72±
	0	0	0.38	0.42	794374.96	0.01	168.46

Elaborado por: Pardo S. & Pérez M., 2019.