

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

Carrera de **INGENIERÍA AMBIENTAL**

“APLICACIÓN DE *PSEUDOMONAS* COMO AGENTE BIORREDUCTOR DEL CROMO HEXAVALENTE DE LOS EFLUENTES DE LAS CURTIEMBRES DEL DISTRITO EL PORVENIR, 2022”

Tesis para optar el título profesional de:

**INGENIERA AMBIENTAL**

**Autor:**

Stefanny Xiomara Sanchez Huaccha

Asesores:

Ing. Grant Ilich Llaque Fernández

<https://orcid.org/0000-0002-6793-775X>

Mg. Jessica Marleny Lujan Rojas

<https://orcid.org/0000-0001-8781-4231>

Trujillo - Perú

Aplicación de pseudomonas para proponer una biorremediación del cromo por reducción en los efluentes de las curtiembres del distrito el porvenir, 2022.

### JURADO EVALUADOR

Jurado 1 Presidente(a)	<b>FERNANDO UGAZ ODAR</b>	<b>18098186</b>
	Nombre y Apellidos	Nº DNI

Jurado 2	<b>WILBERTO EFFIO QUEZADA</b>	<b>42298402</b>
	Nombre y Apellidos	Nº DNI

Jurado 3	<b>RONALD ALVARO OBESO</b>	<b>44562630</b>
	Nombre y Apellidos	Nº DNI

## **DEDICATORIA**

Le dedico con todo mi corazón esta tesis a mis padres Santos Sánchez Angulo & Marisol Huaccha Álvarez a quienes debo lo que soy, que siempre me apoyaron incondicionalmente a lo largo de mi vida para poder formarme como profesional.

También a quien ha sido mi mano derecha durante mi carrera universitaria Eddy Escobar, gracias por tus consejos que me han llevado por el buen camino, con mucho respeto y gratitud de corazón.

*Stefanny Sánchez Huaccha*

## **AGRADECIMIENTO**

Primeramente, agradezco a Dios por permitirme concluir esta investigación, por darme una familia quienes me han apoyado en cada decisión y proyecto.

A mi universidad por las oportunidades en el desarrollo de mi carrera y a mis maestros por las enseñanzas brindadas.

*Stefanny Sánchez Huaccha*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>JURADO EVALUADOR.....</b>	<b>2</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b>4</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>6</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO II. METODOLOGIA .....</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>71</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla .</b>	Condiciones físicas, químicas y biológicas necesarias para la reducción del Cr (VI) por especies del género Pseudomonas.....	31
	¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Condiciones fisicoquímicas de las aguas residuales de las Curtiembres del distrito El Porvenir, La Libertad.....	33
<b>Tabla 1.</b>	Toma de decisiones con base a criterios cualitativos de selección para la elección de la especie idónea con el fin de reducir químicamente el cromo hexavalente de los efluentes de las curtiembres del Distrito El Porvenir .....	37
<b>Tabla 2.</b>	Condiciones físicas, químicas y biológicas para el crecimiento óptimo de la especie elegida del género Pseudomonas spp. para la reducción del cromo hexavalente de los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir, La Libertad.....	38

---

<b>Tabla 5.</b>		
.	Resumen de la propuesta ambiental para biorremediar las aguas residuales contaminadas con cromo de las Curtiembres del distrito El Porvenir .....	39
<b>Tabla 6.</b>	Resumen de la 1 fase de la propuesta ambiental para biorremediar los efluentes contaminados con cromo de las curtiembres del distrito El Porvenir.....	40
<b>Tabla 7.</b>	Resumen de la 2 fase de la propuesta ambiental para biorremediar los efluentes contaminados con cromo de las curtiembres del distrito El Porvenir.....	41
<b>Tabla 8.</b>	Matriz de Consistencia .....	70
<b>Tabla 9.</b>	Matriz de Operacionalización de las Variables.....	71
<b>Tabla 10.</b>	Datos de las Curtiembres de estudio .....	79

<b>Tabla 11.</b>	Consideraciones para la toma de muestra y preservación del agua residual de las Curtiembres .....	84
<b>Tabla 3.</b>	Límites Máximos Permisibles para el sector curtiembre .....	86
<b>Tabla 4.</b>	Componentes y cantidades del Agar Cetrimide .....	87
<b>Tabla 5.</b>	Diferenciación de las pruebas bioquímicas entre las especies de P. aeruginosa, P. putida y P. fluorescens .....	88
<b>Tabla 6.</b>	Medio de cultivo para Pseudomonas putida para 3,7 L y 1 L .....	91
<b>Tabla 7.</b>	Especificaciones técnicas del biorreactor Airlift .....	95
<b>Tabla 8.</b>	Grupos experimentales de las cinéticas de biorremediación de Cr (VI) .....	102
<b>Tabla 9.</b>	Cronograma de ejecución de actividades para el funcionamiento del sistema de biorremediación a escala de laboratorio .....	105
<b>Tabla 20.</b>	Personal disponible para la ejecución del proyecto .....	106
<b>Tabla 21.</b>	Locales disponibles para la ejecución del proyecto .....	106
<b>Tabla 22.</b>	Costos de los equipos para la construcción del sistema de biorremediación a escala de laboratorio .....	107
<b>Tabla 10.</b>	Costos de los insumos para la preparación del medio y caldo de cultivo .....	108
<b>Tabla .</b>	Costos de los utensilios de uso personal .....	109
<b>Tabla .</b>	Costos de los servicios involucrados para el sistema de biorremediación .....	110

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Frecuencia de uso de las diferentes especies de Pseudomonas en la reducción química del cromo hexavalente de los artículos originales seleccionados.....	34
<b>Figura 2.</b>	Eficiencia de la reducción química del cromo hexavalente de las diferentes especies de Pseudomonas analizadas en los artículos originales seleccionados.....	35
<b>Figura 3.</b>	Concentración inicial de Cr (VI) de la reducción química producida por las diversas especies de Pseudomonas analizadas en los artículos originales seleccionados.....	36
<b>Tabla 7.</b>	Resumen de la fase 2 de la propuesta ambiental para biorremediar los efluentes contaminados con cromo de las Curtiembres del distrito El Porvenir	

---

**PROPUESTA AMBIENTAL EN BASE AL USO DE *Pseudomonas* spp. PARA LA**

**BIORREMEDIACIÓN DE LOS EFLUENTES DE LAS CURTIEMBRES DEL  
DISTRITO EL PORVENIR**

---

<b>FASE 2</b>	<b>PASOS</b>	<b>MÉTODOS</b>
<b>Preparación del inóculo de <i>Pseudomonas putida</i> cromo resistente para el sistema de biorremediación de los efluentes de las Curtiembres del Distrito El Porvenir</b>	Aislamiento de <i>Pseudomonas</i> sp. cromo resistente de los efluentes de las Curtiembres del Distrito El Porvenir	Se aislarán en agar Cetrimide y se sembrarán mediante la técnica de agotamiento y estría en agar Cetrimide suplementadas con cromo Cr (VI) en forma de dicromato de potasio a 100 mg/L, incubándose en aerobiosis a 30°C, durante 48 horas y seleccionándose las colonias pigmentadas y no pigmentadas.
	Aislamiento y caracterización fenotípica de <i>Pseudomonas putida</i> cromo resistente	Tinción de Gram, Producción de Fluoresceína (agar F), Producción de piocianina (agar P), Prueba de licuefacción de gelatina, Crecimiento a 4°C, Crecimiento a 42°C
	Mantenimiento de cultivos de <i>Pseudomonas putida</i> cromo resistente	En agar tripticosa soya (TSA) durante 24 horas y se mantendrán bajo refrigeración (8°C) hasta su posterior uso, realizándose subcultivos cada 30 días.
	Evaluación de la capacidad de tolerancia de los aislados de <i>Pseudomonas putida</i> al cromo hexavalente	Se determinará la concentración mínima inhibitoria (CMI) del Cr (VI) sobre el crecimiento de los aislados. El cultivo que crece a concentración de 100 mg/L de cromo se transferirá a cultivos con concentraciones de 200 mg/L, 400 mg/L, 600 mg/L, 800 mg/L, 1000 mg/L y 1200 mg/L.
	Evaluación de la capacidad de tolerancia de los aislados de <i>Pseudomonas putida</i> a otros metales pesados	Del aislado se determinará su resistencia a otros metales pesados como el plomo, cobre, aluminio y titanio. La concentración de estos metales pesados en la prueba será de 200 mg/L y 400 mg/L
	Evaluación de la sensibilidad y el patrón de resistencia de <i>Pseudomonas putida</i> a los antibióticos	Se determinará la susceptibilidad a antibióticos mediante el método de difusión de pocillos de Kirby Bauer en agar TSA. Se utilizarán antibióticos como ampicilina, estreptomycin, ácido nalidíxico y penicilina
	Determinación de la cinética de crecimiento de la cepa resistente de <i>P. putida</i> a metales pesados en presencia de metales pesados	Se realizará en agar TSA suplementadas con 400 mg/L de metales pesados como cromo, plomo, cobre, aluminio y titanio. El crecimiento se determinará mediante absorbancia a 600 nm en diferentes intervalos de tiempo.
	Preparación del inóculo de <i>Pseudomonas putida</i> para uso en el biorreactor	Se preparará una suspensión en solución salina fisiológica estéril a $3 \times 10^6$ células /mL empleando un nefelómetro de Mac Farland. Se preparará en medio líquido.

.	Esquema sobre la construcción de un sistema de biorremediación para aguas residuales contaminadas con cromo hexavalente de las curtiembres del distrito El porvenir usando <i>P. putida</i> .....	42
<b>Figura .</b>	Flujograma sobre la operación del sistema de biorremediación usando <i>P.putida</i> para las aguas residuales contaminadas con cromo hexavalente de las curtiembres del distrito El Porvenir .....	43
<b>Figura.</b>	Ubicación geográfica de la Curtiembre León de Juda S.A.C en el distrito El Porvenir .....	78
<b>Figura .</b>	Ubicación geográfica de la curtiembre León de Juda S.A.C en el distrito El Porvenir .....	79
<b>Figura 10.</b>	Construcción de un Biorreactor air-lift adaptado de Guevara (2004).....	97
<b>Figura 11.</b>	Soporte para el Biorreactor air-lift de tubos concéntrico adaptado de Guevara (2004).....	98

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio es analizar la aplicación de *Pseudomonas* para la biorremediación del cromo hexavalente presente en los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir. Para esto, se hicieron dos búsquedas bibliográficas: la primera en repositorios nacionales, seleccionándose estudios que describieran las condiciones fisicoquímicas en las que se encuentran los efluentes; y la segunda en bases de datos como NCBI, ScienceDirect, SpringerLink y ResearchGate, seleccionándose artículos que detallaran *Pseudomonas* con la facultad de biorreducir el Cr(VI) a Cr(III). Se encontró que los efluentes no cumplen los límites máximos permisibles del MINAM, encontrándose altos niveles de Cr(VI) y de otros parámetros. Además, de las 8 especies encontradas en 15 artículos, se determinó que *P. putida* es la especie idónea para la biorreducción debido a su baja patogenicidad, susceptibilidad moderada a antibióticos, fácil identificación y a sus características de crecimiento (30°C, pH 5-10). Asimismo, se logró plantear un sistema de biorremediación de bajo costo económico en base al uso de biorreactores Airlift. Se concluye que la aplicación de *P. putida* como propuesta técnica-ambiental es viable y factible para su implementación y puede llegar a disminuir los niveles de Cr(VI) en los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir.

**Palabras clave:** biorremediación, remoción, contaminación, *Pseudomonas*, cromo

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la gran mayoría de las industrias de curtiduría operan actualmente con ciertas medidas de control para la contaminación y no colocan en riesgo la salud de las poblaciones locales. Los grandes fabricantes de calzado analizan cuidadosamente las instalaciones de sus proveedores para asegurarse de que se encuentren bien administradas. No obstante, en muchas partes del mundo, sobre todo en países de tercer mundo, se han descubierto una serie de pequeñas curtiembres con operaciones no apropiadas que generan zonas muy contaminadas con niveles peligrosos de productos químicos. Estos sitios plantean importantes riesgos para la salud pública de las comunidades cercanas y para los ecosistemas aledaños (Pure Earth, 2016)

La industria del cuero consta de una serie de procesos distintos, siendo el curtido de pieles en bruto, el más importante de ellos. El curtido consiste en el tratamiento del cuero crudo para hacerlo más resistente y duradero al uso en una gran variedad de productos. El cuero liviano se usa comúnmente para zapatos y bolsos, y el cuero pesado se usa para correas y cinturones. El proceso de curtido se compone de tres fases generales: adquisición y pretratamiento de las pieles animales en bruto; tratamiento de las pieles con un curtiente; y secado y abrillantado de las pieles antes de enviarlas a los fabricantes de productos. Aunque estos pasos ilustran el proceso general, a menudo hay muchos procesos diferentes que se pueden llevar a cabo en las instalaciones de curtido, y cada uno puede proporcionar una variedad de otros servicios (Shindhal et al., 2021)

Hoy en día, aproximadamente el 80-90% de los cueros del mundo se procesan mediante la técnica de curtido con sulfato de cromo, la cual utiliza diversas soluciones químicas ácidas y salinas. Este proceso de curtido es muy rápido, tomando alrededor de un día para producir una pieza de cuero curtido. Los compuestos de cromo se aplican para proteger las pieles del deterioro, haciéndolas más duraderas contra la humedad y el envejecimiento. El cromo interactúa con las fibras de la piel cruda durante un proceso de baño, después del cual las pieles curtidas se escurren y preparan para el acabado (Pure Earth, 2016).

Alrededor del 2% de los 24 millones de toneladas de cromo se utiliza para producir sulfato de cromo, que se utilizará en la fabricación de varios materiales de curtido, así como tintes y plásticos. A nivel mundial, se producen alrededor de 480 000 toneladas de taninos de cromo cada año. Los depósitos de cromo más grandes del mundo se encuentran en Sudáfrica, lo que representa el 33% de la producción, mientras que las cifras de India y Kazajstán son del 20% y el 17%, respectivamente. Brasil, Finlandia, Omán, Rusia y Turquía aportaron un 21 % adicional, mientras que otros 12 pequeños países productores aportaron un 9 %. (SilvaTeam, 2015)

El cromo (Cr) es un metal de transición con una masa atómica de 51,996 g/mol y un número atómico de 24. En la naturaleza, este se encuentra en forma de cromita (Fe, Mn, Cr<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) y es el séptimo elemento más abundante de la tierra, con concentraciones que van de 100 a 300 µg/g. El cromo existe en diferentes estados de oxidación, siendo el cromo hexavalente [Cr (VI)] y trivalente [Cr (III)], las especies más comunes y estables. El Cr III) está presente en forma de hidróxidos, óxidos y sulfatos, ligados a la materia orgánica de la

superficie terrestre y medios acuáticos, y el Cr(VI) suele estar asociado al oxígeno en forma de iones cromato ( $\text{CrO}_2^{-4}$ ) o dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_2^{-7}$ ) (Focardi et al., 2013)

Toxicológicamente, el Cr(VI) es la forma química muy peligrosa para los sistemas biológicos, ya que puede inducir diferentes efectos mutagénicos, cancerígenos y teratogénicos según lo descrito por diferentes organizaciones de ámbito internacional como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA). La acción tóxica del Cr(VI) se debe a su capacidad para introducirse rápidamente en la membrana celular de células procariontas y eucariotas, y de generar efectos deletéreos tales como la destrucción de la integridad de la membrana o la inhibición de sistema energético mitocondrial. Al ingresar a la célula, el Cr(VI) produce diversas reacciones espontáneas con los reductores intracelulares como el ascorbato y el glutatión, generando agentes químicos intermediarios de vida corta como los radicales libres, y estados de oxidación de como: Cr(IV), Cr(V) y el Cr(III) (Pavesi & Moreira, 2020)

En el citoplasma, el Cr(V) se oxida a Cr(VI) y en el proceso se producen especies reactivas de oxígeno que se combinan fácilmente con los complejos de ADN-proteína. Se sabe que las especies de Cr(VI) y los radicales hidróxidos causan lesiones en el ADN. A diferencia de este, el Cr(III) es casi impermeable a la membrana plasmática, por lo que éste solo tiene una milésima parte de la toxicidad del Cr(VI) (Pavesi & Moreira, 2020). En este sentido, es posible concluir que, que la actividad tóxica del cromo depende del estado de oxidación en la que se encuentra, siendo el Cr(VI) altamente deletéreo para la mayoría de los seres vivos, y el Cr(III) relativamente inocuo siendo este último un oligoelemento para el mantenimiento del metabolismo de carbohidratos en mamíferos y levaduras, sugiriéndose

que puede estar implicado en la estructura terciaria de ciertas proteínas y en la conformación del ARN y ADN (Levina & Lay, 2008)

Ciertas características del Cr(VI) son una gran preocupación medioambiental a nivel global. El Cr(VI) es un fuerte agente oxidante y en los suelos ácidos y con materia orgánica se reduce a Cr(III). No obstante, las altas concentraciones de Cr(VI) pueden superar la actividad reductora del medio ambiente y perdurar en esta forma. Se sabe que el Cr(VI) se encuentra muy disperso en sedimentos y aguas superficiales, y se caracteriza por una solubilidad, movilidad y biodisponibilidad mucho mayores que el Cr(III) y todas las formas de cromo. Como consecuencia de esta alta solubilidad en agua y elevada movilidad, el Cr(VI) se difunde fácilmente lejos del sitio original de contaminación. Además, el aumento del pH del suelo aumenta la lixiviabilidad del Cr(VI). En presencia de condiciones oxidantes, el Cr(VI), en forma de aniones cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) y bicromato ( $\text{HCrO}_4^-$ ), es extremadamente soluble y móvil (Focardi et al., 2013)

En los últimos años, organizaciones como *Pure Earth* y fundaciones como *Green Cross Switzerland* han estimado que, a nivel global aproximadamente casi 5 millones de personas se encuentran altamente expuestas al cromo. A partir de 2016, el Programa de Identificación de Sitios Tóxicos ha identificado más de 300 sitios en todo el mundo donde existen altos niveles de exposición de cromo (Pure Earth, 2016). Según la información recopilada por el Instituto Blacksmith de EE. UU, los países de Sur de Asia, India y Pakistán, son los que tienen los mayores indicadores de contaminación por cromo en todo el mundo, teniendo la mayor cantidad de industrias de curtido. Después del continente asiático,

Sudamérica es el continente con el mayor índice de contaminación y con el mayor número de industrias de curtido, distribuidos principalmente entre los países de Argentina, Ecuador y Perú (Jenkins et al., 2002)

En el Perú, la contaminación por cromo va en aumento siendo las regiones de Pasco, Callao, Junín, Lima y Lambayeque los lugares más afectados desde el 2018 según el Ministerio de Salud (MINSA, 2019). En este sentido, la Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento (SUNASS), ha establecido los límites máximo permisibles (LMP) para el cromo en el agua potable, estableciéndose que sus niveles no deben exceder los 0,05 mg/L según las normas internaciones de la OMS (SUNASS, 2004). Sin embargo, a través del programa de vigilancia epidemiológica, el ministerio de salud ha notificado aproximadamente un total de 1507 casos de exposición a metales pesados en el 2016 (MINSA, 2016) y 6164 casos en el 2018, siendo Cerro de Pasco el lugar más contaminado por cromo (MINSA, 2019), lo cual es un indicador de que no se llegar a cumplir la legislación ambiental establecida.

En el departamento de La Libertad, la incidencia de casos de exposición al cromo es relativamente baja, sin embargo, esto puede llegar a cambiar debido con el tiempo debido. En la provincia Trujillo, existen curtiembres formales e informales las cuales presentan riesgos de contaminación en perspectivas diferentes. Las curtiembres formales no cuentan en realidad con un plan eficiente de mitigación de cromo para sus aguas residuales, basándose solo en tratamientos primarios. Además, los impactos ambientales negativos se ven exacerbados por el hecho de que la mayoría de las curtidurías informales también se ubican entre las zonas residenciales de los asentamientos populares, cuya infraestructura no está

diseñada con fines industriales. A esto se suma la falta de integración de los factores ambientales en la planificación urbana y la debilidad del gobierno para mejorar las condiciones ambientales de la ciudad (Rosner, 1998)

El Porvenir es una de las ciudades más conocidas de la región La Libertad y uno de los once distritos más poblados de la provincia de Trujillo, que en los últimos 40 años ha aumentado su población hasta 4 veces, estimándose aproximadamente un total de 229,115 habitantes hasta el 2021. Este distrito se encuentra ubicada al este del centro histórico de Trujillo y en ella se puede observar la gran concentración comercial de tiendas de cuero, ferias y talleres para la fabricación de zapatos y otros servicios, fruto del esfuerzo, decisión y perseverancia de sus ciudadanos, lo cual ha posicionado al distrito como un referente productivo en el país. A nivel nacional, El distrito El Porvenir se caracteriza por su gran dinamismo para la producción artesanal de calzados siendo una de las ciudades más importantes para la industria del cuero, ya que concentra un gran número de empresas de carácter industrial (Municipalidad Distrital de El Porvenir, 2019).

Lamentablemente, en la actualidad las curtiembres de este distrito tienden a generar efluentes altamente contaminadas por cromo, los cuales desembocan en el río Moche y finalmente termina en el mar (Ravello Alva, 2017). Los procesos de curtido que producen residuos líquidos, sólidos y gaseosos se distinguen por su alta carga orgánica y la presencia de agentes químicos que pueden presentar acciones tóxicas como el azufre y el cromo. Las variaciones en el volumen de residuos y la concentración de cargas contaminantes ocurren dependiendo de las materias primas a procesar y la tecnología utilizada. Entre las diferentes

zonas de producción, la fase de curtido tiene un efecto relativamente grande en la toxicidad y salinidad de las aguas residuales, ya que, si bien durante este proceso se le agrega sulfato de cromo a la piel, dándole a la piel un color celeste, generalmente no presenta mayor toxicidad dentro de las aguas residuales generadas; sin embargo, el cromo seguirá siendo blanco de una verdadera persecución normativa (Pinedo Ochoa, 2012)

Hasta la actualidad, no se conoce la implementación de algún plan de mitigación o de gestión ambiental que se esté aplicando o diseñando para solucionar esta problemática de contaminación, lo cual podría traer consecuencias muy serias en tiempos futuros (Pinedo Ochoa, 2012). Para tratar sus aguas residuales, las curtiembres del distrito El Porvenir sólo emplean métodos tradicionales de remediación como los pretratamientos y tratamientos primarios los cuales incluyen métodos físico-químicos como la sedimentación, flotación, coagulación – floculación y filtración, reducción química, decantación y la adsorción en superficies porosas. Aunque estas estrategias son eficientes, presentan ciertas limitaciones como la producción elevada de lodos, la poca rentabilidad por la cantidad productos químicos necesarios y el consiguiente riesgo de contaminación secundaria (Tumolo et al., 2020). Debido a esto, en los últimos años existe una enorme preocupación por la contaminación producida por los efluentes de las curtiembres.

Existen otros métodos no tradicionales de remediación que se vienen desarrollando a nivel mundial a escala piloto y de laboratorio, y que han reportado resultados prometedores. Estos métodos consisten en la aplicación de bacterias resistentes al cromo como agentes biológicos de remediación (Focardi et al., 2013). Entre las diferentes especies bacterianas, las especies del género *Pseudomonas* se han mostrado como especies biorremediadoras promisorias para dar inicio a tratamientos alternativos. Sin embargo, la carencia de

propuestas técnicas que fundamenten su aplicación sobre aguas industriales a escala real, ha limitado su implementación y desarrollo en nuestro país. Es por ello que es conveniente realizar la investigación a partir de la siguiente pregunta: ¿De qué manera se realizaría la aplicación de *Pseudomonas* spp para la biorreducción del cromo hexavalente en los efluentes de curtiembres del distrito El Porvenir, 2022?

La presente investigación se sostiene con base a conceptos y teorías sobre la biorremediación bacteriana, proceso biotecnológico potencialmente efectivo que emplea las habilidades catalíticas de ciertas bacterias para la eliminación total o parcial de los contaminantes y/o su transformación de compuestos químicos muy peligrosos en compuestos finales menos peligrosos. En una biorremediación efectiva, es necesario conocer detalladamente las propiedades biológicas de la especie bacteriana y los factores físicos y químicos necesario para su crecimiento como la temperatura, el pH, el oxígeno y los nutrientes (Garbisu et al, 2002).

Entre los diferentes tipos de biorremediación, la reducción biológica o biorreducción se presenta como un proceso potencialmente útil para la recuperación de sitios contaminados por Cr(VI). Este tipo de biorremediación consiste en la reducción química del Cr(VI) a Cr(III), es decir, ganar algunos electrones. Teniendo en cuenta la insolubilidad del Cr(III) en medios acuosos, ésta puede ser precipitada posteriormente a través de la adición de compuestos inorgánicos ternarios como el hidróxido de sodio (NaOH) o hidróxido de calcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (Tumolo et al., 2020)

Los microorganismos resistentes al Cr(VI) representan una real oportunidad para disponer de métodos seguros, económicos y respetuosos y ahora se considera un método alternativo eficaz a los procesos convencionales primarios. Entre los diferentes enfoques

biotecnológicos, la reducción microbiana de Cr(VI) es rentable y ecológica y puede ofrecer una alternativa viable de biorremediación (Focardi et al., 2013). Los microorganismos resistentes al cromo son responsables de la biorreducción del Cr(VI) a Cr(III) menos móvil y su consiguiente precipitación (Itankar & Patil, 2014) lo que podría ser un método efectivo para la desintoxicación de los efluentes contaminados con Cr(VI) del distrito El Porvenir.

A pesar de la elevada toxicidad del Cr(VI), algunos microorganismos como *Pseudomonas* evidencian cierta resistencia a este metal pesado, mostrando además la facultad biológica de reducir el Cr(VI) a Cr(III). El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, del orden *Pseudomonadales* y se caracterizan por ser bacilos Gram negativas móviles con uno o más flagelos polares que crecen formando colonias claras. Metabólicamente, presentan actividad oxidasa y catalasa positiva, siendo principalmente aerobios, no fermentadores de lactosa y con capacidad de crecimiento en agar cetrímide, un medio de cultivo de aislamiento específico para este género. Diversas especies de *Pseudomonas* sintetizan ciertos pigmentos difusibles como la pirrubina (rojo-pardo), la piocianina (azul verdoso), la pioverdina (amarillo verdoso) y la fluoresceína (amarillo) (Madigan et al., 2015)

Hasta la fecha, se han identificado aproximadamente más 100 especies en el género *Pseudomonas*, siendo las más conocidas: *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. veronni*, *P. umsongensis*, *P. entomophila*, *P. gessardii* entre otros. Generalmente, estas especies de *Pseudomonas* son bacterias mesófilas y quimiorganotrofos que sobreviven en temperaturas en un rango de entre 4 - 42°C y presentan plasticidad genética y versatilidad metabólica. Se distribuyen ampliamente en la corteza terrestre y se pueden encontrar en la materia orgánica en descomposición, en el suelo, en el agua, y en la vegetación. Muchas de

ellas, se localizan además en los hospitales públicos, sobre todo, en zonas húmedas de los equipos de análisis y de terapia respiratoria, en las soluciones desinfectantes e incluso en los alimentos (Madigan et al., 2015).

Las diferentes especies del género *Pseudomonas* presentan ciertas enzimas en su estructura que les permite reducir químicamente el Cr(VI) a Cr(III). Las cromato-reductasas (ChrR) son las más estudiadas en el género, los cuales son flavoproteínas solubles dependiente de NADH que presentan una amplia especificidad de sustrato y que les permite una biorreducción dependiente de NAD(P)H de quinonas, profármacos e iones. Para la biotransformación a Cr(III), las ChrR catalizan una combinación de transferencias de uno y dos electrones a Cr(VI) con la concomitante formación de una especie muy inestable del cromo, el Cr(V) y luego se produce una reducción adicional final a Cr(III). Aunque una proporción del intermedio Cr(V) se reoxida espontáneamente para generar especies reactivas de oxígeno, su reducción a Cr(III) a través de la transferencia de dos electrones minimiza la producción de radicales dañinos (Viti et al., 2014)

Los diversos estudios realizados sobre la actividad enzimática de ChrR purificada de *P. putida* indican que esta enzima tiene una actividad del tipo quinona reductasa durante la reducción de iones cromato. Los quinoles producidos por la reducción de quinonas confieren cierta tolerancia o resistencia a la exposición de diversas especies reactivas de oxígeno (Gonzalez et al., 2005). Las especies reactivas generadas por la actividad enzimática de ChrR durante la reducción de Cr(VI) deberían ser principalmente neutralizadas por las quinoles formados en la actividad de la quinona reductasa de la misma enzima (Ackerley et al., 2004;

Cheung & Gu, 2007; Ramírez-Díaz et al., 2008). En este sentido, aunque la actividad de ChrR genera especies reactivas de oxígeno durante la reducción química del Cr(VI), éste reduce las quinonas presentes en la reacción, las cuales brindan protección contra estas especies reactivas (Ramírez-Díaz et al., 2008)

Hasta la actualidad, diversas especies del género *Pseudomonas* han demostrado biorreducir eficientemente el Cr(VI) a Cr(III) en diversos estudios científicos y en variadas condiciones fisicoquímicas. Kang et al., (2015) encontraron que *P. aeruginosa* a una concentración celular del 4% disminuyó eficientemente en un 72% los niveles iniciales de Cr(VI) de 100 mg/mL bajo condiciones fisicoquímicas anaeróbicas, pH 7, temperatura de 37°C, y con fuentes orgánicas de glucosa al 2 g/L como donantes de electrones. Por otra parte, Sonwani et al., (2019) encontraron que la cepa MTCC 1072 de *P. putida*, reduce significativamente, en un 86.4%, concentraciones iniciales de Cr(VI) de 10 - 100 mg/L en condiciones fisicoquímicas aeróbica, con pH 7-8 y temperatura a 35 °C y en un periodo de 12 horas, utilizándose para ello sustancias inorgánicas como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 1.5 g/L y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 1.5 g/L.

Además, Garg et al., (2018) reportaron que la cepa de SKG-1 de *P. putida* a una concentración bacteriana de  $2.8 \times 10^6$  UFC/mL reduce significativamente en 72 h la concentración inicial de Cr(VI) de 77 mg/L en un 63.5% en condiciones ambientales de aerobiosis, pH 8 y temperatura de 25°C. Asimismo, Venkatesan & Subramani, (2019) encontraron que un aislado de *P. putida* reduce significativamente en 12 horas, un 90% del Cr(VI) inicial de 28 mg/L, en condiciones de anaerobiosis, a pH 7,0 y temperatura 37 °C. Así también, Kaur & Kumar, (2014), encontraron que, en condiciones de anaerobiosis, pH

5,2 y una temperatura de 37°C, la cepa MTCC 102 de *P. putida* disminuye significativamente en un 88% las concentraciones iniciales de Cr(VI) de 1000 µg/mL en un periodo de 96 h. Asimismo, Poornima et al. (2010) reportaron que *P. putida* reduce eficientemente en un 90% las concentraciones iniciales de cromo residual de 100 µg/mL en condiciones de anaerobiosis, pH 7-8 y en una temperatura de 30 °C, en un lapso de tiempo de 24 h.

Asimismo, Deepali (2011) encontró que *P. putida*, a una concentración bacteriana poblacional de  $2.5 \times 10^5$ , reduce significativamente en un 82.92% los niveles de cromo iniciales de 2383 mg/L en condiciones de anaerobiosis, pH 7.30 - 7.86, temperatura de 30 °C y en un periodo de 96 h. Además, Mawgoud (2015) reportaron que la cepa SC106 de *P. fluorescens*, a una concentración bacteriana del 1%, disminuyó significativamente en un 98.89% las altas concentraciones de cromo hexavalente iniciales de 570 mg/L en condiciones de anaerobiosis, pH 7,0 y temperatura de 30 °C utilizando como donante de electrones a la sucrosa al 1%.

Existen otras especies menos conocidas que tienen la facultad de reducir el Cr(VI) a un estado de Cr(III) en diversas condiciones. En la India, Wani et al. (2019) reportaron que *P. entomophila* produjo una reducción significativa de hasta un 84% del Cr(VI) en una concentración inicial de 100 mg/L, en aguas residuales industriales y en condiciones fisicoquímicas de pH de 7 y de 35 °C en un periodo de 120 horas. En China, Huang et al. (2016), encontraron que *P. gessardii* redujo significativamente 10 mg/L de Cr(VI) a Cr(III) hasta un 95% en un biorreactor aireado en 16 días.

Yao et al. (2020), hallaron que *P. umsongensis* redujo significativamente las concentraciones iniciales de Cr(VI) (10 mg/mL) en 72 h y en condiciones de anaerobiosis, pH 7 y 30 °C, con el uso glucosa, glicerol, formiato de sodio, etc como donantes de

electrones. Asimismo, Alessandrello & Vullo (2016) demostraron que *P. veronii* reduce el 100% del Cr(VI) inicial de 40 mg/L, en condiciones de anaerobiosis, pH 3 y 32 °C, en un tiempo de 72 h y usando glicerol (5 g/L) como donante de electrones. Del mismo modo, Ozturk et al., (2012) encontraron que, en anaerobiosis, pH 7 y a 37 °C, *P. stutzeri* redujeron en un 67% las concentraciones iniciales de Cr(VI) de 10 mg/mL en 48 horas.

El desarrollo de la presente tesis se justifica desde diferentes puntos de vista. En el aspecto de la conveniencia, este estudio propone el desarrollo de una tecnología económicamente más rentable, ecológica, sostenible y altamente eficiente para la biorreducción del Cr(VI) que los tratamientos primarios convencionales. Además, presenta relevancia ya que contribuirá al desarrollo social mejorando el estado de salud de los pobladores que viven en las zonas aledañas contaminadas con cromo. Por otra parte, este estudio plantea una aplicación práctica a escala de laboratorio que puede implementarse a futuro para la reducción de los niveles de Cr(VI) de los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir. Por último, este estudio permitirá la construcción de un plan metodológico para el desarrollo, creación y optimización de protocolos de biorremediación por biorreducción a futuro utilizando especies del género *Pseudomonas*.

Actualmente, se desconoce propuestas ambientales que permitan disminuir eficientemente los niveles de Cr(VI) presente en los efluentes de las curtiembres en condiciones reales de contaminación. Debido a esto, esta investigación tiene como objetivo general: Establecer una aplicación de biorremediación por *Pseudomonas* spp. para el cromo hexavalente presentes en los efluentes de curtiembres del distrito El Porvenir, teniendo como base artículos de investigación. En este sentido, se tendrá como objetivos específicos: Diagnosticar las condiciones fisicoquímicas de los efluentes en las curtiembres del distrito

El Porvenir comparando con los límites máximos permisibles del Ministerio del Ambiente;  
Seleccionar la especie idónea del género *Pseudomonas* para biorreducir el cromo hexavalente en efluentes de curtiembres; y plantear una propuesta ambiental para aplicar la biorreducción de cromo hexavalente en los efluentes de las curtiembres de distrito El Porvenir.

## CAPÍTULO II. METODOLOGIA

La presente de investigación presenta un *enfoque cuantitativo*, ya que se centra principalmente en la obtención de datos con un propósito de medición numérica para responder al problema de investigación planteado (Neil & Cortez Suárez, 2018). Además, su diseño es *no experimental* ya que no se llegan a manipular variables y solo se observan los fenómenos como se encuentran en un determinado contexto de la realidad. Según el nivel de profundización del estudio, este trabajo de investigación es del *tipo descriptivo* puesto que se trabaja detalladamente con la realidad misma y comprende además el registro, análisis e interpretación de los fenómenos y sus procesos, siendo su característica fundamental, presentarnos una interpretación correcta de las variables establecidas respectivas (Hernández et al., 2018).

Con respecto a la población de estudio el cual se conceptualiza como un conjunto finito o infinito de elementos y/o individuos con características comunes, este estudio consideró una población del tipo infinita, ya que se desconoce el número de elementos que lo componen, la cual estuvo conformado por *artículos originales* que describieran “especies del género *Pseudomonas* con capacidad de biorreducir el Cr(VI) a Cr(III)” (Hernández et al., 2018). La muestra, un conjunto de casos, elementos o individuos extraídos de una población por algún tipo de muestreo (Neil & Cortez Suárez, 2018), estuvo representada en este estudio por 15 artículos originales, cuya selección se realizó mediante el *método no probabilístico*, la cual consiste en la selección de artículos sin algún tipo de aleatoriedad y que más le convienen más al investigador.

En relación al método de investigación empleado, este estudio utilizó el *método inductivo* ya que de datos particulares se obtuvo un conocimiento general, es decir, del análisis de las variables involucradas en el objetivo del estudio se realizaron generalizaciones científicas que permitieron sostener afirmaciones de la hipótesis (Hernández et al., 2018). Asimismo, según lo descrito por Arias (2020), se utilizó, como técnica de recolección de datos, el *análisis documental* ya que los datos se obtuvieron de fuentes secundarias de diversas bases de datos. Asimismo, como instrumento de recolección de datos, se utilizó las *fichas de registro de datos* para obtener información de los artículos.

Estructuralmente, esta investigación se desarrolló en 3 fases: En la primera se realizó un **diagnóstico situacional de las condiciones fisicoquímicas en la que se encuentran los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir**. Para esto, se realizaron diversas búsquedas exhaustivas de estudios publicados de hasta 10 años de antigüedad en diversos repositorios nacionales, recopilando datos sobre parámetros físicos-químicos como el pH, la temperatura, sólidos suspendidos totales (SST), demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>), demanda química de oxígeno (DQO), aceites y grasas, sulfuros y cromo final (total, hexavalente y trivalente).

Se incluyeron estudios con base a los siguientes criterios: nombre de la curtiembre analizada y con una descripción detallada de los parámetros fisicoquímicos de sus efluentes (Tabla 1), así como también con la evidencia respectiva de que los análisis fisicoquímicos de los efluentes se hallan realizado por instituciones autorizadas legalmente y/o de reconocimiento nacional. Posteriormente, con base a lo dispuesto por el MINAM, se realizó el diagnóstico situacional de los efluentes según lo descrito en los límites máximos permisibles de la Legislación Ambiental - R. N° 201-2007-CONAM-PCD (MINAM, 2009)

La segunda fase del estudio consistió en **seleccionar la especie idónea y las condiciones fisicoquímicas óptimas para biorreducir el cromo hexavalente en efluentes de curtiembres**. Para esto se realizaron búsquedas exhaustivas de artículos originales en diferentes bases de datos internacionales como PubMed, ScienceDirect, Google Scholar, ResearchGate, usando términos de búsqueda que se emplearon como (("chromium") OR ("cromo")), (biorremediation) OR ("biorremediación"), (("tanneries") OR ("curtiembres")), (("effluents") OR ("efluentes")), AND (*Pseudomonas spp.*) AND year cluster: ("2010" OR "2011" OR "2012" OR "2013" OR "2014" OR "2015" OR..... ""2020" OR "2022").

De la búsqueda, se seleccionaron artículos en un rango de 10 años de antigüedad. Como criterios de inclusión, se tuvieron en cuenta datos como: eficiencia de reducción, metodología precisa, validada y reproducible. Por otra parte, se excluyeron artículos como revisiones narrativas y sistemáticas, cartas al editor, comentarios y/o otros tipos de manuscritos que no se pueda acceder a la información completa. Además, no se seleccionaron artículos en la que se utilicen otras especies de microorganismos que no se encuentren dentro del género de *Pseudomonas*.

Se eliminaron los duplicados y se realizaron dos tamizajes: El primero consistió en verificar el título y resumen de cada manuscrito y para eso se empleó el programa en línea Rayyan. El segundo tamizaje consistió en realizar un análisis a texto completo y verificar que los estudios del primer tamizaje cumplieran con los criterios de selección y para eso se empleó el programa ZOTERO. Se elaboró una tabla teniendo en cuenta datos como: la concentración inicial del Cr(VI), especie de *Pseudomonas* empleada, y las condiciones fisicoquímicas en la que se desarrolla como: pH, temperatura, presencia de oxígeno, donantes de electrones, fuentes de carbono, nitrógeno y fosforo (Tabla 2).

De los artículos originales elegidos, se seleccionaron y establecieron las condiciones biológicas y fisicoquímicas idóneas para la biorreducción del Cr (VI) en base a: *criterios cuantitativos* mediante el análisis de criterios como la frecuencia de uso de la especie como agente biorreductor (Figura 1), la eficiencia (Figura 2), y su tolerancia de biorreducción en altas concentraciones de cromo inicial (Figura 3); y *criterios cualitativos*, como su patogenicidad en humanos, animales y vegetales, resistencia a los antibióticos, capacidad de crecimiento y desarrollo sobre condiciones extremas de pH, temperatura, condiciones de oxígeno, etc. Además, se tuvieron en cuenta otros criterios importantes como las ventajas en la obtención de la bacteria, gasto económico en el manejo de cultivo, etc.

La tercera fase de la investigación consistió en plantear **una propuesta técnica-ambiental de biorremediación por biorreducción para el Cr (VI) basada en las condiciones fisicoquímicas de los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir**. Por ello, se seleccionó la especie de *Pseudomonas* idónea y se planteó una propuesta desarrollada a nivel de laboratorio con el uso de biorreactores Airlift. Para evaluar su viabilidad y factibilidad, se tuvieron en cuenta criterios como presupuesto, infraestructura y los equipos disponibles en la Universidad Privada del Norte. Además, se realizó un plan de trabajo, un cronograma de actividades (cuadro 1) y el análisis de los recursos disponibles y no disponibles (Tabla 9). Asimismo, el estudio contó con un marco ético de trabajo, ya que se cumplió con las normas establecidas por la guía de la Universidad Privada del Norte descrita en la Resolución Rectoral/UPN, para la elaboración de redacción y ejecución de tesis, la cual se adecua a la norma internacional ISO-690. Estas normas indican la no alteración o modificación de la información recopilada en los artículos originales, respetando además los derechos del autor.

### **CAPÍTULO III. RESULTADOS**

Para establecer una aplicación de biorremediación por *Pseudomonas* teniendo como base artículos de investigación, se analizaron 15 artículos originales, encontrándose un total de 8 especies biorreductoras como: *P. aeruginosa*, *P. umsongensis*, *P. veronii*, *P. putida*, *P. entomophila*, *P. stutzeri*, *P. gessardii* y *P. fluorescens*. Además que las especies se desarrollan en diferentes temperaturas ( $25^{\circ}\text{C}$  -  $37^{\circ}\text{C}$ ) y en diferentes valores de pH (5 - 8). Asimismo, se encontró que algunas especies son facultativas en sistemas anaerobios y que utilizan diferentes fuentes de carbono como glucosa, glicerina, alcohol butírico, ácido cítrico, acetato de sodio, ácido oxálico, lactosa y sucrosa (Tabla 1).

En el diagnóstico situacional de los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir, se encontraron un total de 5 estudios sobre 4 curtiembres (Chimú S.A.C, INDENORSAC, Curtipiel S.A y Curtiembre D Leyse) de las 70 que existen en el distrito. Además, se encontraron datos entre los años 2008-2017, sobre parámetros físicos-químicos como el pH, la temperatura, sólidos suspendidos totales (SST), demanda bioquímica de oxígeno ( $\text{DBO}_5$ ), demanda química de oxígeno (DQO), aceites y grasas, sulfuros y cromo final (total, hexavalente y trivalente) (Tabla 2).

En relación a la selección de la especie idónea del análisis de los 15 artículos originales, se encontró datos como la frecuencia de uso (Fig.1), eficiencia de reducción (Fig. 2) y con base a criterios cualitativos se determinó la elección de la especie idónea (Tabla 3). Además, se determinó las condiciones físicas, químicas y biológicas para el crecimiento óptimo de la especie idónea (Tabla 4).

Según datos biotecnológicos y financieros, se determinó que la propuesta técnica-ambiental de biorremediación en base al uso de biorreactores del tipo Air Lift, presenta viabilidad para su implementación. Además, se determinó la factibilidad de su implementación a escala de laboratorio realizando un análisis detallado del alcance, del procedimiento y el plan de acción (Tabla 5), teniendo en cuenta el marco legal, el diseño de construcción y el presupuesto necesario para desarrollarlo (Anexo 2).

**Tabla 1.**

Condiciones físicas, químicas y biológicas necesarias para la reducción el Cr (VI) por especies del género *Pseudomonas*

N°	Condiciones Biológicas			Condiciones Físicas			Condiciones Químicas		Ref.
	Cr (VI) Inicial	Especie Cepa/Aislado	Densidad Celular	pH Inicial	Temperatura, agitación y tiempo	Tipo de ambiente	Fuentes iniciales de C, N y P	Eficiencia de reducción	
1	10 a 100 mg/L.	<i>P. aeruginosa</i> AB93066	4%	7,0	37 °C, 150 rpm, 24 h.	Biorreactor Aeróbico	Glucosa (2 g/L)	72%	Kang et al., 2015
2	20 - 40 mg/L	<i>P. aeruginosa</i> AB93066	5 x 10 <sup>8</sup>	7.0	37 °C, 180 rpm, 24 h.	Biorreactor Aeróbico	Glucosa (2 g/L) Glicerina (2 g/L) Alcohol butírico (2 g/L) Ácido cítrico (2 g/L) Acetato de sodio (2 g/L) Ácido oxálico (2 g/L) Lactosa (2 g/L) Sucrosa (2 g/L)	72% 62% 49% 45% 28% 27% 23% 18%	Kang et al., 2014
3	10 mg/L	<i>P. umsongensis</i> CY-1	1×10 <sup>7</sup>	7.00	30 °C, 180 rpm, 72 h.	Biorreactor Anaeróbico	Glucosa Glicerol Formiato de sodio Lactato de sodio Acetato de Sodio NADH	23,6% 22,7% 15,4% 32,4% 11,3% 18,8%	Yao et al., 2020
4	40 mg/L	<i>P. veronii</i> 2E	--	3.00	32 °C, 150 rpm, 72 h.	Biorreactor Anaeróbico	Glicerol (5 g/L)	100%	Alessandrell & Vullo, 2016
5	28 mg/L	<i>P. putida</i> Aislado	--	7,00	30 °C, 100 rpm, 12 h.	Biorreactor Anaeróbico	--	90%	Venkatesan & Subramani, 2019

7	10 - 100 mg/L.	<i>P. putida</i> MTCC 1072	--	7-8	35 °C, 150 rpm, 12 h.	Biorreactor Aeróbico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.5 (g/L) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.5 (g/L)	86.4%	Sonwani et al., 2019
8	77 mg/L	<i>P. putida</i> SKG-1	2.8×10 <sup>6</sup>	8,00	25°C, 150 rpm, 72 h.	Biorreactor Aeróbico	Glucosa (0.8%) Peptona (0.6%) Extracto de levadura (0.6%)	63.5%	Garg et al., 2018
9	100 mg/L	<i>P. aeruginosa</i> Aislado	--	6,80	30 °C, 150 rpm, 48 h.	Biorreactor Anaeróbico	Caldo nutritivo	94.73%	Munawaroh et al., 2017
10	1000 µg/mL	<i>P. putida</i> MTCC 102	--	5,2	37 °C, 150 rpm, 96 h.	Biorreactor Anaeróbico	Medio Deleo-Ehrlich	88%	Kaur & Kumar, 2014
11	10 mg/L	<i>P. stutzeri</i> Aislado	--	7,0	37 °C, 150 rpm, 48 h.	Biorreactor Anaeróbico	NH <sub>4</sub> Cl (1 g/L) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.5 g/L) Acetato de sodio (5 g/L)	67%	Ozturk et al., 2014
12	23,83 mg/L	<i>P. putida</i> Aislado, B2, B5, B9	2.5 ×10 <sup>5</sup>	7.30- 7.86	30°C, 96 h.	Biorreactor Anaeróbico	Caldo nutritivo	82.92%	Deepali, 2011
13	100 µg/mL	<i>P. putida</i>	--	7-8	30°C, 150 rpm, 24 h	Biorreactor Anaeróbico	Glucosa (5 g/L) Peptona (5 g/L)	90%	Poornima et al., 2010
14	10 mg/L	<i>P. gessardii</i> Aislado	--	7,0	28°C, 48h	Biorreactor Aeróbico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 g/L) NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (1 g/L)	95%	Huang et al., 2016
15	570 mg/L	<i>P. fluorescens</i> SC106	1%	7,0	30°C 180 rpm	Biorreactor Anaeróbico	Sucrosa 1%	98.89%	Mawgoud, 2015

**Tabla 2.**

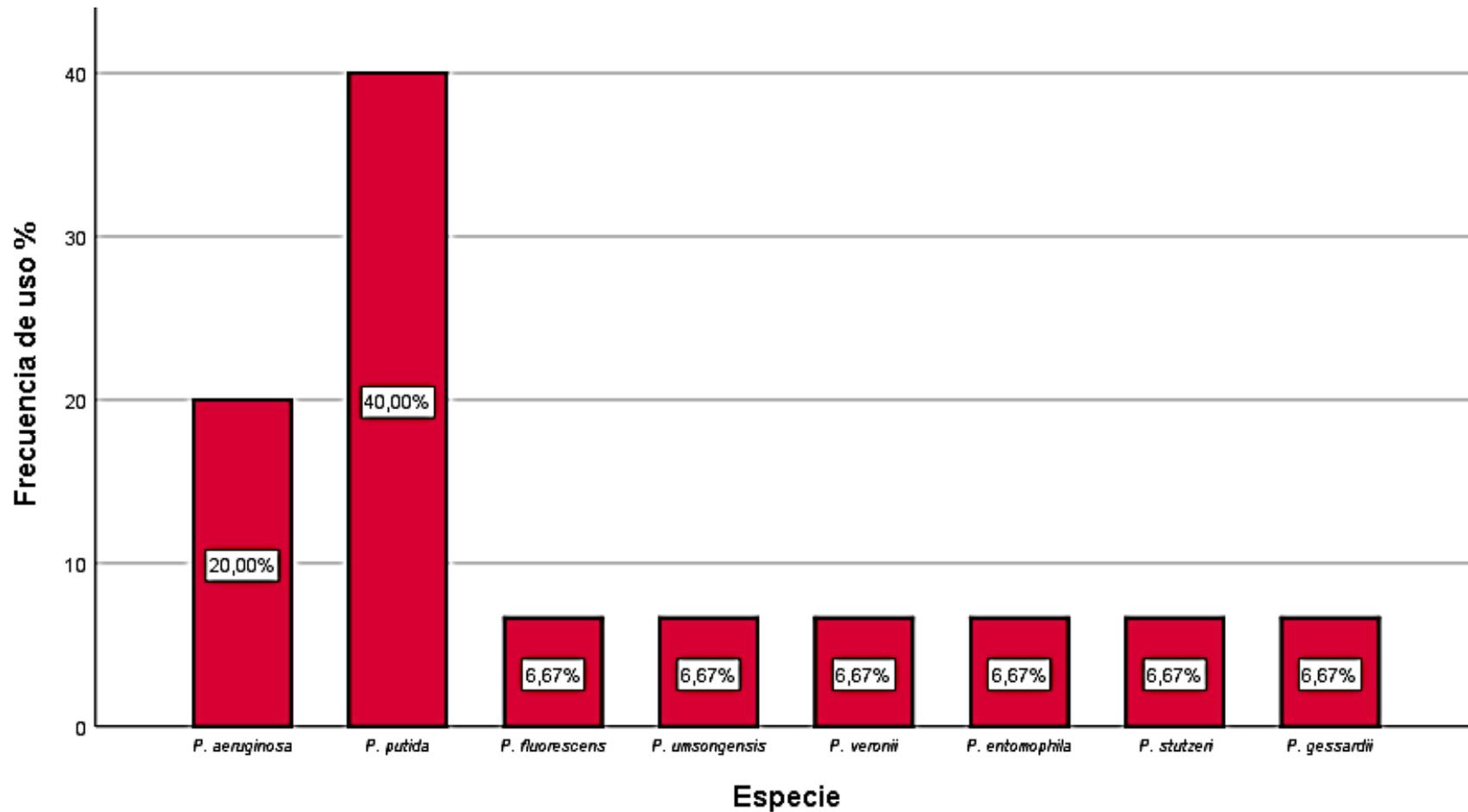
Condiciones fisicoquímicas de las aguas residuales de las Curtiembres del distrito El Porvenir, La Libertad

Referencia	NOMBRE	pH	°C	Aceites y grasas (mg/L)	DBO <sub>5</sub> (mg/L)	DQO (mg/L)	SST (mg/L)	Sulfuros (mg/L)	Cromo final		
									Total (mg/L)	III (mg/L)	VI (mg/L)
Miranda Paz, (2019)	Curtiembre de Chimú S.A.C	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,6147
Silva Villanueva, (2011)	Curtiembre INDENORSAC	9	25	922	1603	5658	6928	180	--	118	--
Silva Villanueva, (2011)	Curtiembre INDENORSAC	9	22	760	1630	6470	6640	183	--	139,8	18
Silva Villanueva, (2011)	Curtiembre INDENORSAC	9	26	852	1140	5125	6904	185	--	201,3	--
Urteaga & Vergara, 2009	Curtiembre Curtipiel S.A.	--	--	--	--	--	--	--	2500	--	--
Carrión & Terrones, 2008	Curtiembre Curtipiel S.A.	9	25	--	--	--	--	183	--	118	--
Pinedo Ochoa, (2012)	Curtiembre D Leyse.	9	25	--	--	--	--	183	--	118	--
<b>LMP (MINAM, 2002)</b>		6-9	35	20	100	1500	150	1	0.2	--	0.4

Leyenda: DBO<sub>5</sub>: Demanda bioquímica de oxígeno; DQO: demanda química de oxígeno; SST: sólidos solubles totales, LMP: límites máximos permisibles

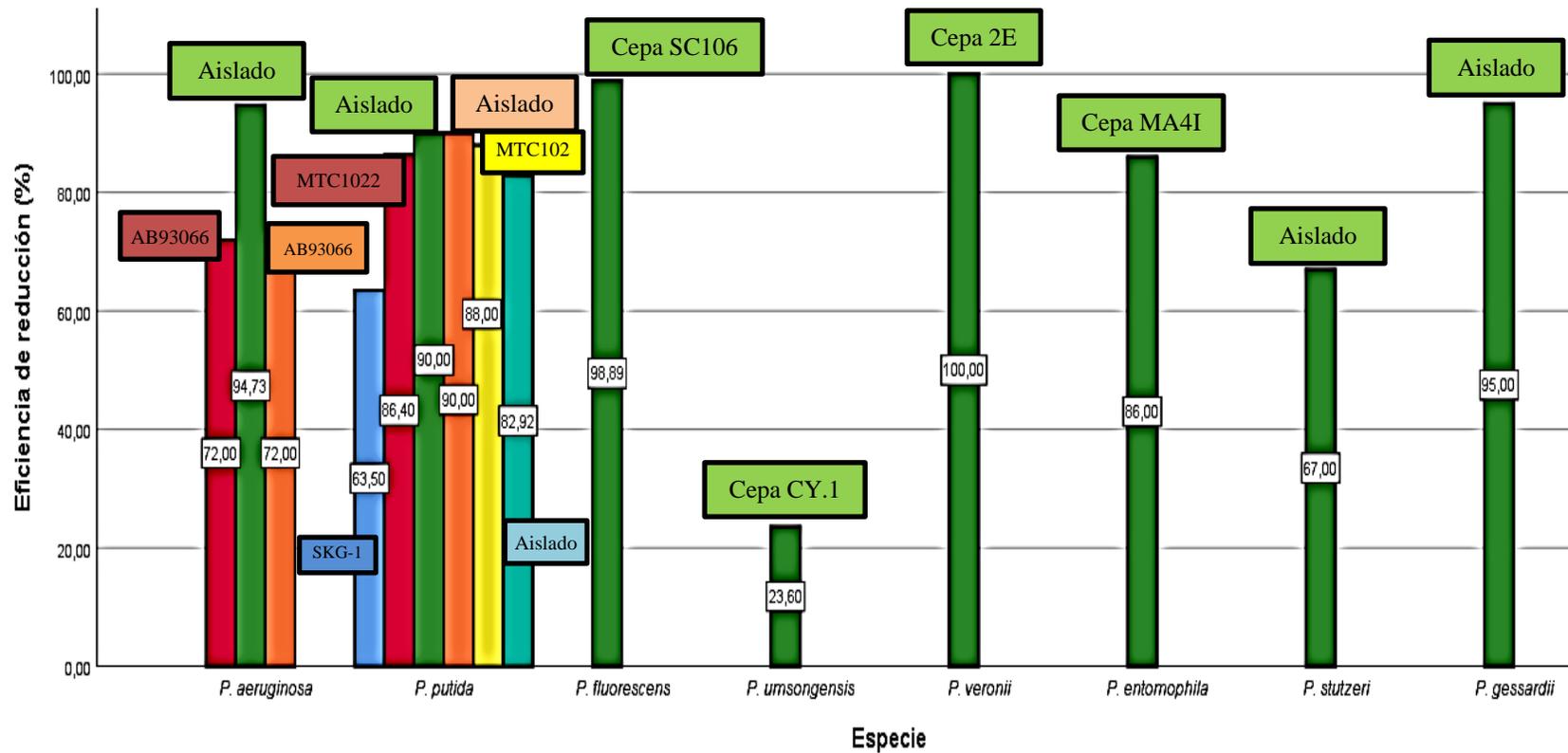
**Figura 1.**

Frecuencia de uso de las diferentes especies de *Pseudomonas* en la reducción química del cromo hexavalente de los artículos originales seleccionados.



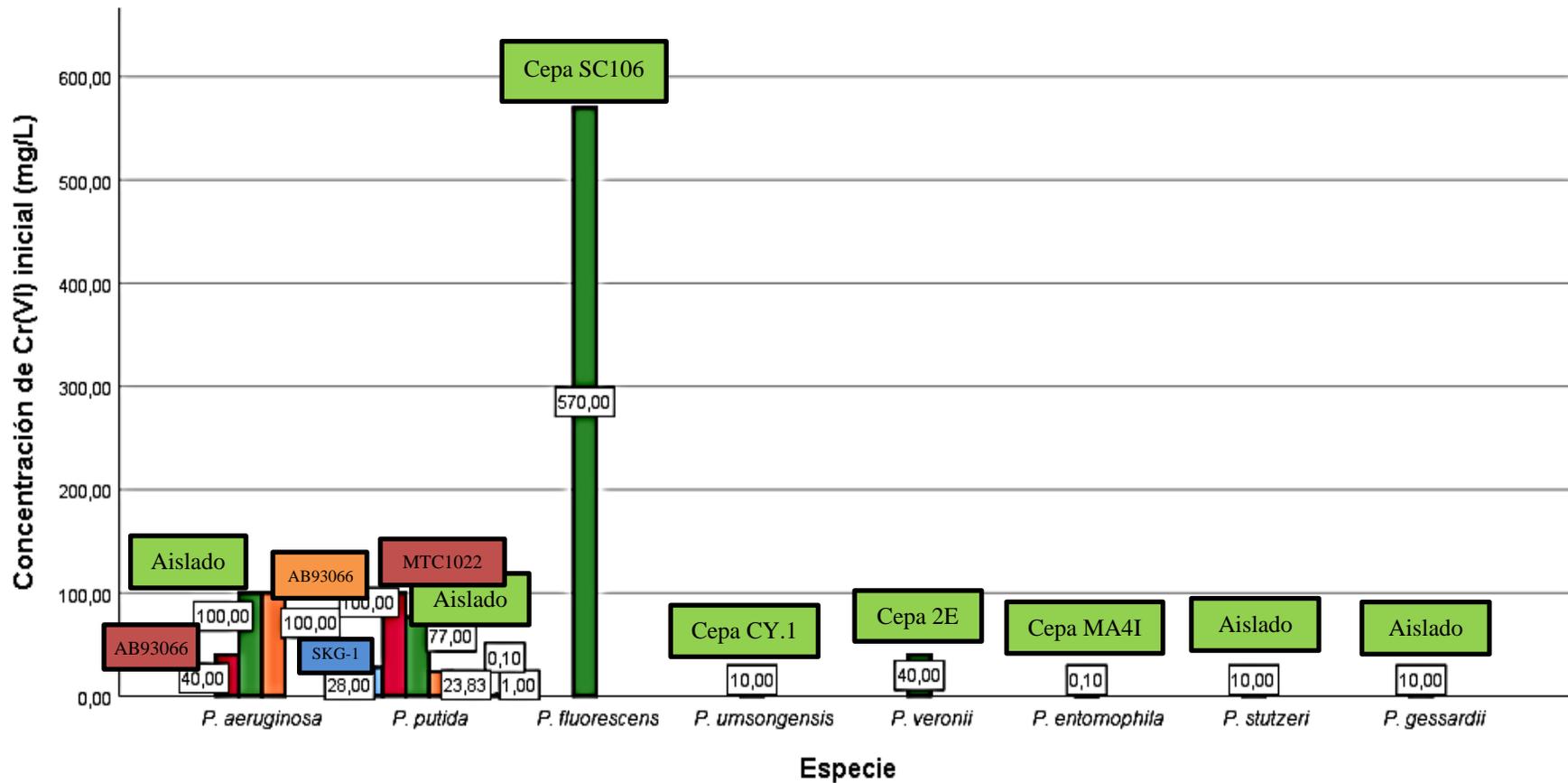
**Figura 2.**

Eficiencia de la reducción química del cromo hexavalente de las diferentes especies de *Pseudomonas* analizadas en los artículos originales seleccionados



**Figura 3.**

Concentración inicial de Cr (VI) de la reducción química producida por las diversas especies de *Pseudomonas* analizadas en los artículos originales seleccionados



**Tabla 1.**

Toma de decisiones con base a criterios cualitativos de selección para la elección de la especie idónea con el fin de biorreducir el cromo hexavalente de los efluentes de las curtiembres del Distrito El Porvenir

<b>Criterios</b>	<b>Patogenicidad</b>	<b>Resistencia a antibióticos</b>	<b>Rango de pH</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Identificación</b>
<b>Especie idónea</b>	Baja	Baja	5-10	25 a 30 °C	Bioquímica
<i>P. aeruginosa</i>	<b>Alta</b> (Azam et al, 2019)	<b>Alta</b> (Horcajada et al., 2019)	<b>4.5-9.5</b> (Klein et al, 2009)	<b>37° C</b> (Barbier et al., 2014)	<b>Bioquímica</b> (Arai et al., 1970)
<i>P. putida</i>	<b>Baja</b> (Tan et al, 2019)	<b>Baja</b> (Tan et al., 2019)	<b>5.5 – 10</b> (Chapatwala, 1998)	<b>30 °C</b> (Frank et al., 2011)	<b>Bioquímica</b> (Blazevic et al., 1973)
<i>P. fluorescens</i>	<b>Moderada</b> (Scales et al, 2014)	<b>Moderada</b> (Patil, 2015)	<b>4.0 - 8.0</b> (Scales et al., 2014)	<b>25 - 30 °C</b> (Donnarumma et al, 2010)	<b>Bioquímica</b> (Blazevic et al., 1973)
<i>P. umsongensis</i>	<b>No reportado</b>	<b>No reportado</b>	<b>7.0</b> (Yao et al., 2020)	<b>30 °C</b> (Yao et al., 2020)	<b>Molecular</b> (Yao et al., 2020)
<i>P. veronii</i>	<b>No reportado</b>	<b>Baja</b> (Montes et al., 2016)	<b>3.0</b> (Alessandrell & Vullo, 2016)	<b>32 °C</b> (Alessandrell & Vullo, 2016)	<b>Molecular</b> (Canchignia et al., 2017)
<i>P. entomophila</i>	<b>Baja</b> (para insectos)	<b>No reportado</b>	<b>7.0</b> (Wani et al., 2019)	<b>35 °C</b> (Wani et al., 2019)	<b>Molecular</b> (Villamizar et al., 2020)
<i>P. stutzeri</i>	<b>Baja</b> (Noble & Overman, 1994).	<b>Baja</b> (Rodríguez-Martínez et al., 2010)	<b>7.0</b> (Ozturk et al., 2014)	<b>37 °C</b> (Ozturk et al., 2014)	<b>Molecular</b> (Mahmood et al., 2009)
<i>P. gessardii</i>	<b>Moderada</b> (Deepika, 2022).	<b>No reportado</b>	<b>7.0</b> (Huang et al., 2016)	<b>28 °C</b> (Huang et al., 2016)	<b>Molecular</b> (Zarei et al., 2020)

**Tabla 2.**

Condiciones físicas, químicas y biológicas para el crecimiento óptimo de *Pseudomonas putida*, la especie idónea para la biorreducción del cromo hexavalente de los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir, La Libertad.

Condición ambiental		Valor
Biológicas	Especie	<i>Pseudomonas putida</i>
	Cepa/aislado	Aislado, cromo resistente
	Inóculo	$>12 \times 10^8$ UFC/mL
Físicas	pH	5 - 10
	Temperatura	25° - 30°C
	Presencia de oxígeno	Aeróbico/Anaeróbico
Químicas	Fuente de Carbono	Glucosa (5 g/L)
	Fuente de Nitrógeno	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (500 mg/L)
	Fuente de Fósforo	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1,5 g/L)

**Tabla 5.**

Resumen de la propuesta ambiental para biorremediar los efluentes contaminados con cromo de las Curtiembres del distrito El Porvenir

PROPUESTA AMBIENTAL SOBRE EL USO DE <i>Pseudomonas spp.</i> PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE LOS EFLUENTES DE LAS CURTIEMBRES DEL DISTRITO EL PORVENIR					
RUBRO	LUGAR	OBJETIVO	ALCANCE	PROCEDIMIENTO	PLAN DE ACCIÓN
<b>Curtiduría</b>	Distrito El Porvenir, Provincia de Trujillo, Departamento de La Libertad	Reducir los niveles de cromo hexavalente de las aguas residuales de las Curtiembres del Distrito El Porvenir usando <i>Pseudomonas putida</i>	El alcance de la propuesta está limitada a un sistema de biorremediación a escala de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Caracterización fisicoquímica de las aguas residuales de las Curtiembres del Distrito El Porvenir</li> <li>➤ Preparación del inóculo de <i>P. putida</i> cromo resistente para el sistema de biorremediación de los efluentes de las Curtiembres del Distrito El Porvenir</li> <li>➤ Construcción de un sistema de biorremediación en base al uso de <i>P.putida</i> y biorreactores Air Lift para las aguas residuales contaminadas con cromo hexavalente de las curtiembres del distrito El Porvenir</li> <li>➤ Operación del sistema de biorremediación usando <i>P. putida</i> para las aguas residuales contaminadas con cromo hexavalente de las curtiembres del distrito El Porvenir</li> </ul>	Disminuir en un 40% los niveles de cromo hexavalente de los efluentes en las curtiembres del distrito El Porvenir usando <i>P. putida</i> . Para esto se debe de contar con el apoyo de la empresa y de las universidades competentes que faciliten el trabajo con bacterias y analicen los niveles iniciales y finales de cromo de los efluentes

**Tabla 6.**

Resumen de la fase 1 de la propuesta ambiental para biorremediar los efluentes contaminados con cromo de las Curtiembres del distrito El Porvenir

<b>PROPUESTA AMBIENTAL EN BASE AL USO DE <i>Pseudomonas</i> spp. PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE LOS EFLUENTES DE LAS CURTIEMBRES DEL DISTRITO EL PORVENIR</b>			
<b>FASE 1</b>	<b>PASOS</b>	<b>PROCEDIMIENTO</b>	<b>CRITERIO</b>
	Obtención de muestras de las aguas residuales provenientes de las Curtiembres del Distrito El Porvenir	Los frascos deben ser rotulados antes de la toma de muestra. Las muestras de agua residual deben colocarse en una caja de almacenamiento térmica con refrigerante (ice pack)	Protocolo de Monitoreo de la Calidad de los Efluentes de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales de la Oficina del Medio Ambiente (OMA, 2013).
<b>Caracterización fisicoquímica de las aguas residuales de las Curtiembres del Distrito El Porvenir</b>	Determinación de los parámetros fisicoquímicos de las aguas residuales de las Curtiembres del Distrito El Porvenir	Se determinarán parámetros fisicoquímicos como pH, temperatura, DBO5, DQO, aceites y grasas, sólidos suspendidos totales y la presencia de ciertos metales pesados como el cromo, arsénico, plomo, etc.,	Según la American Public Health Association (APHA), la American Water Works Association (AWWA) y la Water Environment Federation (WEF) (2012), "Métodos Estándar para el Examen de Agua y Aguas Residuales"
	Evaluación de los parámetros fisicoquímicos de las aguas residuales de las Curtiembres del Distrito El Porvenir	Se compararán los resultados con los Límites Máximos Permisibles (LMP) y Valores Referenciales aplicables por la Autoridad Competente, a las actividades industriales manufactureras de cemento, cerveza, curtiembre y papel	D.S. 003-2002-PRODUCE

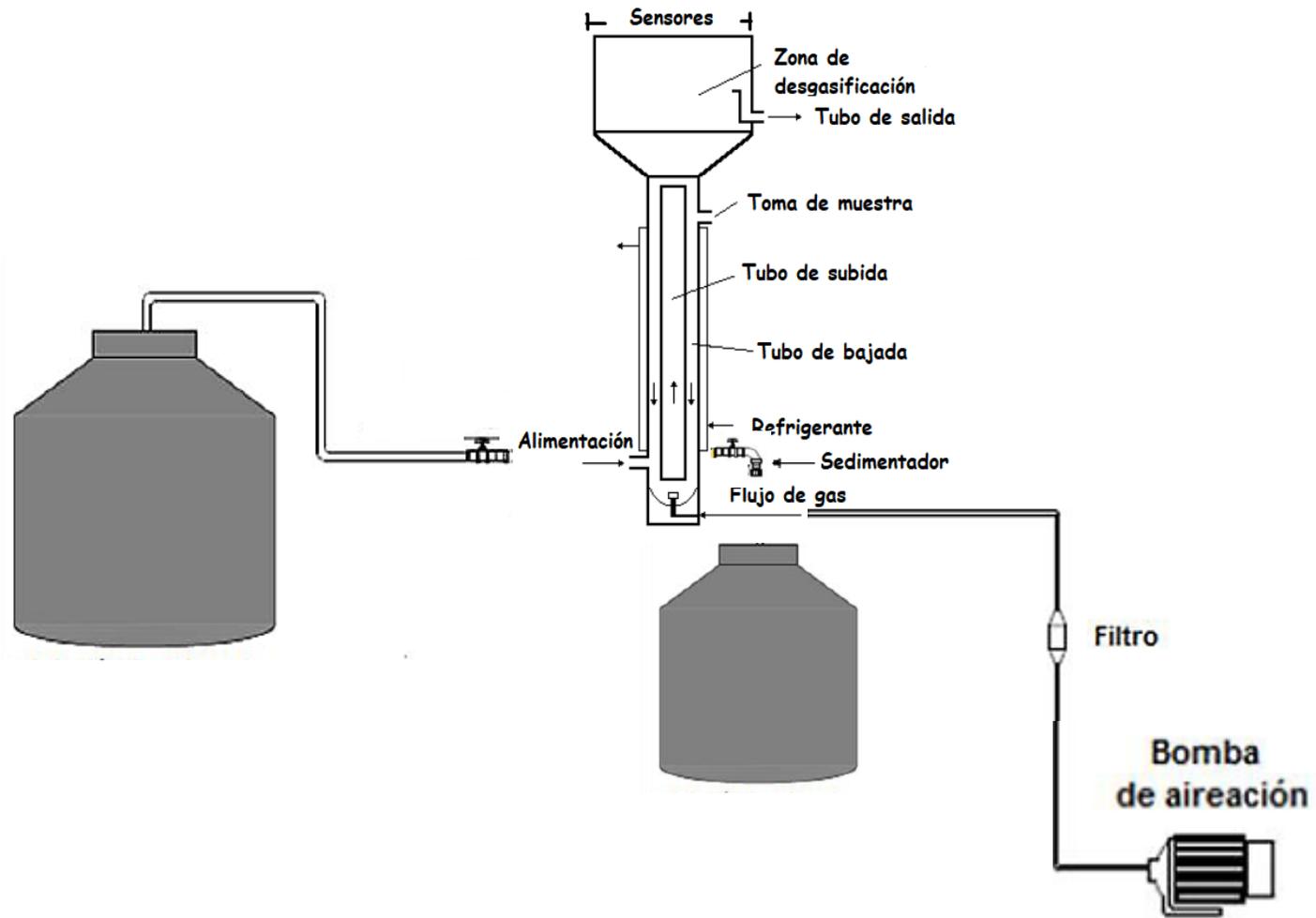
**Tabla 7.**

Resumen de la fase 2 de la propuesta ambiental para biorremediar los efluentes contaminados con cromo de las Curtiembres del distrito El Porvenir

<b>PROPUESTA AMBIENTAL EN BASE AL USO DE <i>Pseudomonas</i> spp. PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE LOS EFLUENTES DE LAS CURTIEMBRES DEL DISTRITO EL PORVENIR</b>		
<b>FASE 2</b>	<b>PASOS</b>	<b>MÉTODOS</b>
<b>Preparación del inóculo de <i>Pseudomonas putida</i> cromo resistente para el sistema de biorremediación de los efluentes de las Curtiembres del Distrito El Porvenir</b>	Aislamiento de <i>Pseudomonas sp.</i> cromo resistente de los efluentes de las Curtiembres del Distrito El Porvenir	Se aislarán en agar Cetrimide y se sembrarán mediante la técnica de agotamiento y estría en agar Cetrimide suplementadas con cromo Cr (VI) en forma de dicromato de potasio a 100 mg/L, incubándose en aerobiosis a 30°C, durante 48 horas y seleccionándose las colonias pigmentadas y no pigmentadas.
	Aislamiento y caracterización fenotípica de <i>Pseudomonas putida</i> cromo resistente	Tinción de Gram, Producción de Fluoresceína (agar F), Producción de piocianina (agar P), Prueba de licuefacción de gelatina, Crecimiento a 4°C, Crecimiento a 42°C
	Mantenimiento de cultivos de <i>Pseudomonas putida</i> cromo resistente	En agar tripticasa soya (TSA) durante 24 horas y se mantendrán bajo refrigeración (8°C) hasta su posterior uso, realizándose subcultivos cada 30 días.
	Evaluación de la capacidad de tolerancia de los aislados de <i>Pseudomonas putida</i> al cromo hexavalente	Se determinará la concentración mínima inhibitoria (CMI) del Cr (VI) sobre el crecimiento de los aislados. El cultivo que crece a concentración de 100 mg/L de cromo se transferirá a cultivos con concentraciones de 200 mg/L, 400 mg/L, 600 mg/L, 800 mg/L, 1000 mg/L y 1200 mg/L.
	Evaluación de la capacidad de tolerancia de los aislados de <i>Pseudomonas putida</i> a otros metales pesados	Del aislado se determinará su resistencia a otros metales pesados como el plomo, cobre, aluminio y titanio. La concentración de estos metales pesados en la prueba será de 200 mg/L y 400 mg/L
	Evaluación de la sensibilidad y el patrón de resistencia de <i>Pseudomonas putida</i> a los antibióticos	Se determinará la susceptibilidad a antibióticos mediante el método de difusión de pocillos de Kirby Bauer en agar TSA. Se utilizarán antibióticos como ampicilina, estreptomycin, ácido nalidíxico y penicilina
	Determinación de la cinética de crecimiento de la cepa resistente de <i>P. putida</i> a metales pesados en presencia de metales pesados	Se realizará en agar TSA suplementadas con 400 mg/L de metales pesados como cromo, plomo, cobre, aluminio y titanio. El crecimiento se determinará mediante absorbancia a 600 nm en diferentes intervalos de tiempo.
	Preparación del inóculo de <i>Pseudomonas putida</i> para uso en el biorreactor	Se preparará una suspensión en solución salina fisiológica estéril a $3 \times 10^6$ células /mL empleando un nefelómetro de Mac Farland. Se preparará en medio líquido.

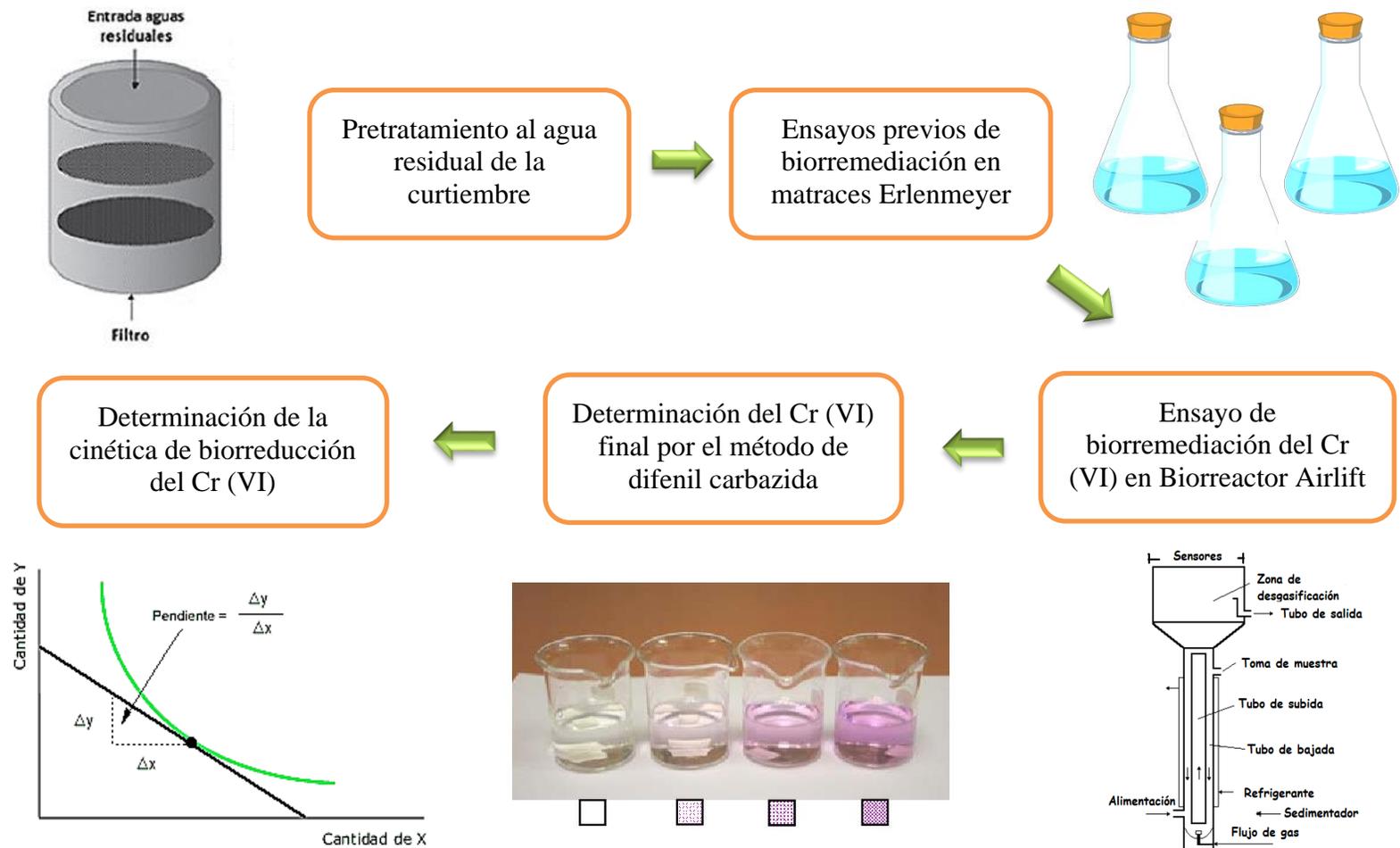
**Figura 4.**

Esquema sobre la construcción de un sistema de biorremediación para aguas residuales contaminadas con cromo hexavalente de las curtiembres del distrito El Porvenir usando *P. putida*



**Figura 5.**

Flujograma sobre la operación del sistema de biorremediación usando *P. putida* para las aguas residuales contaminadas con cromo hexavalente de las curtiembres del distrito El Porvenir



## CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Actualmente, las industrias de curtiembre en el distrito El Porvenir son una gran preocupación medioambiental para la región La Libertad debido a que son fuentes generadoras de aguas residuales altamente contaminantes. Hasta ahora, pocos son los esfuerzos que se realizan para mitigar esta situación, por lo que las pocas medidas de acción se basan en costosos e insuficientes tratamientos primarios convencionales. Es por ello la importancia de desarrollar nuevas alternativas de tratamiento como la biorremediación la cual ofrece ciertas ventajas como efectividad, rentabilidad y carácter ecológico. En este sentido, la presente investigación consideró formular una propuesta ambiental de biorremediación para reducir los niveles de Cr(VI) de los efluentes de las curtiembres de distrito El Porvenir, utilizando *Pseudomonas* como agente biológico.

En primera instancia se planteó como objetivo general establecer una aplicación de *Pseudomonas* spp. para biorremediar el cromo hexavalente presente en los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir, teniendo como base documental, diversos artículos de investigación previamente seleccionados (Tabla 1). Para establecer la aplicación, se realizó en base a los datos encontrados en los artículos como: la frecuencia de uso de la especie para la biorreducción, eficiencia de biorreducción sobre el Cr(VI), calidad de la metodología empleada y precisión de los resultados obtenido. Se analizaron un total de 15 artículos originales, encontrándose 8 especies de *Pseudomonas* biorreductoras de cromo como: *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. umsongensis*, *P. veronii*, *P. entomophila*, *P. stutzeri* y *P. gessardii*.

En los diferentes estudios, se encontraron que, entre las diversas especies de *Pseudomonas*; *P. putida* (40%) y *P. aeruginosa* (20%) son las utilizadas con mayor frecuencia en los procesos de biorreducción del cromo (Figura 1). Esto es debido probablemente a que son especies muy conocidas, y son de fácil aislamiento e identificación en laboratorios de mediana calidad en la que no se necesita equipos muy sofisticados y/o con una mayor tecnología. Estas especies puede ser identificadas bioquímicamente, es decir, con diversas pruebas cualitativas como: prueba de la oxidasa, catalasa, citrato, malonato, crecimiento a 42°C, etc.

Por otra parte, entre los artículos seleccionados se encontraron valores de eficiencia de biorreducción de Cr(VI) en un intervalo mayor al 20% y menor e igual que el 100%. Se reportaron que las especies *P. veronii*, *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. aeruginosa* y *P. putida* presentaron los mayores porcentajes de eficiencia de biorreducción con valores de 100% (Alessandrell & Vullo, 2016), 98,89% (Mawgoud, 2015) y 95% (Huang et al., 2016), 94,73 (Munawaroh et al., 2017) % y 90% (Venkatesan & Subramani, 2019; Poornima et al., 2010), respectivamente (Figura 2).

Estos diversos valores de eficiencia encontrados pueden ser debido a múltiples factores como el tipo de biorreactor empleado, las condiciones fisicoquímicas usadas, el grado de precisión para la determinación del cromo, etc., y de esa manera enmascarar el verdadero potencial de cada especie biorreductora. Asimismo, los estudios seleccionados contaban con una metodología de calidad, es decir, presentaron un diseño experimental apropiado (controles y número de repeticiones) que permitan determinar la precisión y la confiabilidad de los resultados. Los niveles de cromo en los estudios fueron determinados por métodos espectrofotométricos los cuales son fáciles de implementar en los laboratorios.

Se planteó como primer objetivo específico realizar un diagnóstico situacional de las condiciones fisicoquímicas en la que se encuentran los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir teniendo en cuenta los límites máximos permisibles del Ministerio del Ambiente de acuerdo a la legislación ambiental R. N° 201-2007-CONAM-PCD (MINAM, 2009). Según esta legislación, los niveles de Cr(VI) en los efluentes de las curtiembres no deben exceder los valores de 0.5 mg/L en concentración. En el análisis documental realizado en los repositorios nacionales, se encontraron datos muy incompletos sobre los niveles de cromo en los efluentes, hallándose que algunas Curtiembres del distrito como Chimú S.A.C e INDENORSAC exceden por mucho los límites máximos permisibles con respecto al Cr(VI) con valores de hasta 1,6147 mg/L (Miranda Paz, 2019) y 18 mg/L (Silva Villanueva, 2011), respectivamente.

Con respecto a otros parámetros fisicoquímicos analizados de los efluentes se encontró que las curtiembres en estudio también superan por mucho lo establecido en los LMP. En una tesis de licenciatura, Silva Villanueva (2011) reportó que los efluentes de la Curtiembre INDENOSARC presentan valores muy excedentes con respecto a los aceites y grasas (760 – 922 mg/L), DBO<sub>5</sub> (1140 - 1630 mg/L), DQO (5125 – 6470 mg/L) y SST (6640 – 6928 mg/L), cuando los valores aceptables y permitidos para aceites y grasas, DBO<sub>5</sub>, DQO y SST son 20 mg/L, 100 mg/L, 1500 mg/L y 150 mg/L, respectivamente. Además, datos sobre otros parámetros no se llegaron a encontrar en otras curtiembres del distrito como Chimú S.A.C (Miranda Paz, 2019), Curtipiel S.A (Urteaga Rojas & Vergara Medina, 2009; Carrión & Terrones, 2008) y Curtiembre D Leyse (Pinedo Ochoa, 2012). Asimismo, ningún estudio analizado en esta investigación reportó datos sobre la presencia de otros metales pesados en los efluentes de las curtiembres, los cuales podrían estar presentes.

Como segundo objetivo específico se planteó seleccionar la especie idónea del género *Pseudomonas* para biorreducir el cromo hexavalente de los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir. Para esto, se tuvo en cuenta las condiciones fisicoquímicas en la que se encuentran las curtiembres. En los diferentes estudios analizados (Tabla 2), (Miranda Paz, 2019) y Silva Villanueva (2011) encontraron altas concentraciones de cromo hexavalente (1,6147 y 18 mg/L, respectivamente) en las aguas residuales, por lo que es necesaria el uso de una especie cromo resistente de *Pseudomonas*. En base a esto, se realizó un análisis minucioso de las metodologías y resultados de 15 artículos originales seleccionados, encontrándose que diversas especies y/o cepas de *Pseudomonas spp.* pueden ejercer este rol, con la capacidad de tolerar y crecer en estas condiciones, siendo las más usadas y/o conocidas por los investigadores, las especies *P. aeruginosa* (Ashraf et al., 2019), *P. putida* (Sonwani et al., 2019) y *P. fluorescens* (Mawgoud, 2015).

Funcionalmente, *P. putida* ofrece ciertas ventajas en la biorreducción del Cr (VI) con respecto a otras especies como *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* en relación a su implementación como agente biorremediador de los efluentes de las curtiembres de El Porvenir. De hecho, a pesar de que *P. aeruginosa* presenta un gran potencial como agente biorreductor de cromo, tiene ciertas limitaciones como su alta patogenicidad y resistencia a los antibióticos la cual fue descrita por Azam y Khan (2019), encontrándose variada evidencia clínica y siendo un factor de peligro y/o riesgo para la salud del personal que laboraría en el laboratorio de biorremediación. A diferencia de esto, la patogenicidad de *P. putida* es mínima y es frecuentemente susceptible a antibióticos, encontrándose muy raras infecciones en animales y humanos (Fernández et al., 2015). Por otra parte, para su crecimiento óptimo, *P. aeruginosa* requiere temperaturas que van desde los 37°C a 42°C, la

cual no es económicamente favorable para su implementación, debido al alto consumo de energía que se requiere y a la adquisición adicional de equipos que permitan el mantenimiento y la regulación de estas temperaturas. En contraste a ello, *P. putida* tiene la ventaja de crecer óptimamente a temperaturas ambientales que van desde los 25°C a 30°C según lo descrito por Hug y Hunter (1974).

Asimismo, la especie *P. fluorescens* también ha llamado la atención en diversas investigaciones debido a su baja patogenicidad y potencial para biorreducir eficientemente el Cr(VI) sobre todo en condiciones de laboratorio (Figura 3). Sin embargo, su potencial aplicativo en situaciones reales de biorremediación podría encontrarse limitado debido a que las condiciones requeridas para su desarrollo no son compatibles con la naturaleza química encontrada en los efluentes de las curtiembres de El Porvenir. A pesar de que *P. fluorescens* crece óptimamente a temperaturas de entre 25° a 30°C, esta especie requiere un pH neutro para su crecimiento y no se desarrolla sobre condiciones ácidas ( $\text{pH} \leq 4.5$ ) (Fouchard et al., 2005). Los datos reportados por Silva Villanueva, (2011), Urteaga & Vergara, (2009), y Carrión & Terrones, (2008) en los efluentes de las curtiembres de El Porvenir indican valores principalmente alcalinos ( $\text{pH} = 9$ ), lo cual sería, según lo descrito por Fouchard et al., (2005), un ambiente inapropiado para el crecimiento de *P. fluorescens*. Además, existe la posibilidad de que estos valores cambien drásticamente en los efluentes de otras curtiembres. A diferencia de esto, *P. putida* es capaz de tolerar condiciones ácidas ( $\text{pH} \leq 5,0$ ) y crecer óptimamente sobre un amplio rango de pH (5 - 10). Por otra parte, los estudios fisicoquímicos realizados a los efluentes de las curtiembres de El Porvenir, no reportan la presencia de otros metales como el zinc, níquel, hierro, los cuales pueden influir en la eficiencia de reducción por *P. fluorescens* conforme a lo detallado por Appanna et al., (1996).

Con respecto a los parámetros físicoquímicas idóneas para el crecimiento óptimo de *Pseudomonas*, en este estudio se ha propuesto que la suplementación con glucosa y glicerol como fuentes de carbono y donantes de electrones son necesarios para el transcurso de la biorremediación de los efluentes. Aunque las especies de *Pseudomonas* pueden utilizar una gran diversidad de elementos orgánicos como carbohidratos, ácidos orgánicos y alcoholes, no todos de estos presentan la misma eficiencia como donantes de electrones para la reducción de Cr (VI). Kang et al, (2014) y Yao et al, (2020) encontraron que la glucosa y el glicerol son los donantes de electrones más utilizados por los investigadores y los más adecuados debido a su capacidad de oxidarse fácilmente (Murugavelh & Mohanty, 2013). Además, se ha observado previamente que la glucosa puede funcionar como fuente de carbono y donante de electrones a la vez (Wang y Xiao 1995; Pal y Paul 2004).

También se ha propuesto en este estudio (Figura 1), el uso de  $K_2HPO_4$  como fuente de fósforo y el uso de  $NH_4NO_3$  como fuente de nitrógeno, debido a su fácil obtención, uso común y a su valor costo-beneficio. Se ha demostrado que con el agregado de estas fuentes de nitrógeno y fósforo se puede potenciar el crecimiento, desarrollo y multiplicación poblacional de *Pseudomonas spp.* en los efluentes industriales (Ganguli y Tripathi, 2013). Por otra parte, existen otros parámetros que también son importantes considerar como la presencia de oxígeno en los procesos de reducción. Una ventaja de *P. putida* frente a otras especies es su naturaleza facultativa, es decir, puede crecer tanto en ambientes aeróbicos como anaeróbicos, lo cual lo convierte en la especie ideal incluso para la presencia de condiciones extremas. Además de ello, se ha propuesto en este estudio, tiempos de reducción de entre 24 a 72 h, debido a que en tiempos posteriores existen una disminución poblacional debido a la toxicidad ácida de los residuos metabólicos (Garg et al., 2018).

Finalmente, se estableció como tercer objetivo específico plantear una propuesta técnica ambiental viable y factible en base al uso de *P. putida* como agente biológico biorremediador del Cr(VI), teniendo en cuenta las condiciones fisicoquímicas en la que están los efluentes provenientes de las curtiembres del distrito El Porvenir y las propiedades biológicas ventajosas que tiene la especie idónea seleccionada para la biorreducir el cromo, lo cual se describió en el objetivo anterior (Tabla 5). Para esto, se dispuso en primer lugar, la elección del tipo de biorreactor necesario para biorremediar eficientemente los efluentes. Según los hallazgos de la Tabla 2, casi todos los estudios analizados emplean biorreactores clásicos de agitación mecánica para la biorreducción del Cr(VI), los cuales ofrecen buenos resultados, pero funcionalmente no son los más óptimos, debido a la menor homogeneidad en mezcla y daño mecánico a los microorganismos.

Es por ello que esta investigación dispone, en su propuesta técnica, el uso de los biorreactores Airlift como sistema de biorremediación para la biorreducción del cromo hexavalente (Figura 3). Los biorreactores Airlift son reactores de agitación neumática, es decir, el contenido es agitado por una corriente de aire o, a veces por otros gases. Además de la agitación, la corriente de aire y/o tiene la importante función de facilitar el intercambio de material entre la fase gaseosa y el medio, el oxígeno es generalmente transferido al líquido, y en algunos casos el producto de la reacción se elimina a través del intercambio con la fase gaseosa. En este sentido, los biorreactores Airlift ofrecen ciertas ventajas frente a los biorreactores de agitación mecánica como: una construcción más simple, menor consumo de energía, mejor homogeneidad de mezcla, mayor proporción de transferencia de calor y menor daño mecánico para los microorganismos (Mawgoud, 2015).

Cabe mencionar que en el Perú ya existen ciertos estudios que avalan el uso de biorreactores Airlift para biorreducir el Cr(VI). Por ejemplo, Mayta Mendoza & Vela Espinoza, (2015) realizó un estudio sobre la remoción de Cr(VI) por *P. putida* empleando un tipo de biorreactor Airlift de circulación interna y de tubos concéntricos, obteniendo resultados eficientes y con valores mayores al 95% de biorremediación. Sin embargo, estos resultados son preliminares ya que se realizó en base al uso de soluciones de dicromato de potasio como fuente de Cr(VI) y no con efluentes propias de las curtiembres, las cuales presentan condiciones fisicoquímicas muy extremas. Además, las concentraciones de Cr(VI) utilizadas son muy bajas (7mg/L y 50mg/L) en comparación a lo que se puede llegar a encontrar en las aguas residuales, debido a la continua mezcla de los efluentes en los procesos de curtido, lo cual puede llegar afectar negativamente el crecimiento bacteriano.

La construcción de un biorreactor Airlift de material de vidrio y con un soporte de metal del sistema de biorremediación es lo más costoso de la presente propuesta técnica-ambiental y no excede los 16 000 soles. En conjunto, la implementación de la propuesta no excede los 30 000 soles, cuyo presupuesto puede ser financiado por diferentes fondos monetarios provenientes de empresas privadas o públicas como son el Canon minero, PROCIENCIA (antes FONDECYT) y Banco Mundial. En este sentido, la presente propuesta de biorremediación en base al uso de *P. putida* presenta factibilidad para su desarrollo. Asimismo, la propuesta técnica-ambiental presenta también viabilidad ya que se dispone del acceso a las muestras las cuales son necesarias para el aislamiento de *P. putida* cromo resistente, y de los conocimientos teóricos necesarios para la construcción de biorreactores Airlift, que hoy en día se encuentra disponible para su implementación, siendo de sencillo armado e instalación.

Del presente trabajo de investigación se llegan a las siguientes conclusiones: Con respecto al objetivo general planteado se concluye que existen una gran variedad de cepas y/o aislados de especies de *Pseudomonas* spp. que tienen la capacidad de biorreducir eficientemente el cromo hexavalente en aguas industriales y no industriales, en diversas condiciones fisicoquímicas y empleando biorreactores Air Lift como sistemas de biorremediación.

Conforme al primer objetivo específico se concluye que los efluentes procedentes de las curtiembres del Distrito El Porvenir como Chimú S.A.C, INDENORSAC, Curtipiel S.A y Curtiembre D Leyse no cumplen con las normas establecidas en la legislación ambiental decretada por el Ministerio de Ambiente (MINAM), superando significativamente los límites máximos permisibles en diferentes parámetros como pH, sólidos suspendidos totales, aceites y grasas, DBO<sub>5</sub>, DQO, sulfuros y cromo.

En relación al segundo objetivo específico planteado se concluye que entre las diversas especies del género *Pseudomonas* spp., *P. putida* es la que presenta el mayor potencial para su aplicación como agente biorreductor del Cr(VI) de los efluentes provenientes de las curtiembres del distrito El Porvenir, debido a su baja patogenicidad, susceptibilidad moderada a los antibióticos, fácil identificación y a sus características de crecimiento (30°C, pH 5-10).

Finalmente, en base al tercer objetivo específico planteado se concluye que la presente propuesta técnica-ambiental de biorremediación para biorreducir eficientemente el cromo hexavalente de los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir presenta desde punto de vista técnico y financiero, viabilidad y factibilidad para su desarrollo e implementación.

La propuesta ambiental de la presente investigación presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, existe una carencia de datos exactos sobre la naturaleza fisicoquímica actual de las aguas residuales de las curtiembres, lo cual sería necesario medir con precisión antes de cualquier proceso de biorremediación. Parámetros fisicoquímicos como el pH, la conductividad eléctrica, aceites, DQO, DBO<sub>5</sub> los cloruros, los fluoruros, los nitratos, los sulfatos y otros metales pesados como el plomo, cobre, aluminio y titanio son necesarios de conocer para tener una idea de las características genotípicas y fenotípicas que debe presentar el aislado de *P. putida* de las aguas residuales, ya que la presencia de otros químicos y/o metales podría ocasionar interferencias en la biorremediación y disminuir el rendimiento de debido a una disminución y/o inhibición del crecimiento de *P. putida* por citotoxicidad debido a la alta carga metálica (Nweke & Okpokwasili, 2010).

Además, para la aplicación de esta propuesta técnica-ambiental también se deben tener algunas consideraciones. La exposición de una población microbiana de *P. putida* mutada/aclimatada o modificada en un laboratorio sobre un sitio contaminado con Cr(VI) puede ser perjudicial, dado que estas aguas residuales suelen liberarse al río Moche, lo cual podría generar cambios evolutivos en el ecosistema microbiano. Inherentemente, las diferentes especies de *Pseudomonas* tienen la capacidad de transferir sus genes de resistencia a otras bacterias nativas y esto influiría positivamente en la resistencia bacteriana a los antibióticos tanto en el suelo como en el medio acuático. Por lo tanto, la aplicación de cualquier protocolo sobre los efluentes debe realizarse en sistemas totalmente cerrados, y ser erradicados y/o esterilizados antes de su descarga, incluso si no son patógenos (Narayani & Shetty, 2013).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerley, D. F., Gonzalez, C. F., Keyhan, M., Blake, R., & Matin, A. (2004). Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environmental Microbiology*, 6(8), 851-860. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00639.x>
- Alessandrello, M. J., & Vullo, D. L. (2016). Economical fermentation media for the production of a whole cell catalyst for the treatment of Cr(VI)-containing wastewaters. *Revista Argentina De Microbiologia*, 48(3), 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.001>
- Appanna, V. D., Gzásó, L. G., & Pierre, M. St. (1996). Influence of chromium (III) on the ability of *Pseudomonas fluorescens* to adapt to a multiple-metal stress. *Microbiological Research*, 151(4), 387-390. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(96\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(96)80008-5)
- Arai, T., Otake, M., Enomoto, S., Goto, S., & Kuwahara, S. (1970). Determination of *Pseudomonas aeruginosa* by Biochemical Test Methods. *Japanese Journal of Microbiology*, 14(4), 279-284. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1970.tb00525.x>

Arias, J.L. (2020). *Técnicas e instrumentos de Investigación científica* (1ª ed.) Arequipa: ENFOQUES CONSULTING.

Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350-359.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>

Barbier, M., Damron, F. H., Bielecki, P., Suárez-Diez, M., Puchałka, J., Albertí, S., Dos Santos, V. M., & Goldberg, J. B. (2014). From the environment to the host: Re-wiring of the transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* from 22°C to 37°C. *PloS One*, 9(2), e89941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089941>

Blazevic, D. J., Koepcke, M. H., & Matsen, J. M. (1973). Incidence and Identification of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in the Clinical Laboratory. *Applied Microbiology*, 25(1), 107-110.

Canchignia, H., Altimira, F., Montes, C., Sánchez, E., Tapia, E., Miccono, M., Espinoza, D., Aguirre, C., Seeger, M., & Prieto, H. (2017). Candidate nematocidal proteins in a new *Pseudomonas veronii* isolate identified by its antagonistic properties against *Xiphinema index*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 63(1), 11-21.  
<https://doi.org/10.2323/jgam.2016.07.001>

Carrión, O. & Terrones P. (2008). *Evaluación económica de alternativas tecnológicas en el control de la contaminación de curtiembres en el distrito de Trujillo*. Tesis de Licenciatura publicada en Línea. Universidad Nacional de Trujillo

Chapatwala, K. D., Babu, G. R., Vijaya, O. K., Kumar, K. P., & Wolfram, J. H. (1998). Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20(1), 28-33. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900469>

Cheung, K. H., & Gu, J.-D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(1), 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.05.002>

Deepali (2011). Bioremediation of Chromium (VI) from Textile Industry's Effluent and Contaminated Soil Using *Pseudomonas putida*. *Iranica Journal of Energy and Environment*, 2(1), 24-31.

Deepika, J. (2022). *Pseudomonas gessardii*—A novel pathogenic bacterium associated with the cases of corneal ulcers and producing virulent pyoverdine pigment. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.7324/JABB.2022.100209>

Donnarumma, G., Buommino, E., Fusco, A., Paoletti, I., Auricchio, L., & Tufano, M. A.

(2010). Effect of temperature on the shift of *Pseudomonas fluorescens* from an environmental microorganism to a potential human pathogen. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 23(1), 227-234.

<https://doi.org/10.1177/039463201002300120>

Frank, S., Schmidt, F., Klockgether, J., Davenport, C. F., Gesell Salazar, M., Völker, U., &

Tümmler, B. (2011). Functional genomics of the initial phase of cold adaptation of *Pseudomonas putida* KT2440. *FEMS Microbiology Letters*, 318(1), 47-54.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02237.x>

Fernández, M., Porcel, M., de la Torre, J., Molina-Henares, M. A., Daddaoua, A., Llamas,

M. A., Roca, A., Carriel, V., Garzón, I., Ramos, J. L., Alaminos, M., & Duque, E.

(2015). Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains. *Frontiers in Microbiology*, 6, 871. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00871>

Focardi, S., Pepi, M., & Focardi, S. E. (2013). Microbial Reduction of Hexavalent Chromium

as a Mechanism of Detoxification and Possible Bioremediation Applications. En

*Biodegradation—Life of Science*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/56365>

Fouchard, S., Abdellaoui-Maâne, Z., Boulanger, A., Llopiz, P., & Neunlist, S. (2005).

Influence of growth conditions on *Pseudomonas fluorescens* strains: A link between metabolite production and the PLFA profile. *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 211-

218. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.003>

- Ganguli, A., & Tripathi, A. K. (1999). Survival and chromate reducing ability of *Pseudomonas aeruginosa* in industrial effluents. *Letters in Applied Microbiology*, 28(1), 76-80. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00457.x>
- Garg, S. K., Garg, S., Tripathi, M., & Singh, K. (2018). Microbial Treatment of Tannery Effluent by Augmenting Psychrotrophic *Pseudomonas putida* Isolate. *Environmental Pollution and Protection*, 3(1), 23-39. <https://doi.org/10.22606/epp.2018.31003>
- Gonzalez, C. F., Ackerley, D. F., Lynch, S. V., & Matin, A. (2005). ChrR, a soluble quinone reductase of *Pseudomonas putida* that defends against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 22590-22595. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501654200>
- Hernández, A., Ramos, M., Placencia, B., Indacochea B., Quimis, A., Moreno, Luis. (2018). *Metodología de la Investigación científica* (1ª ed). 3Ciencias.
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., Benito, N., & Grau, S. (2019). Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4), e00031-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>

Huang, H., Wu, K., Khan, A., Jiang, Y., Ling, Z., Liu, P., Chen, Y., Tao, X., & Li, X. (2016).

A novel *Pseudomonas gessardii* strain LZ-E simultaneously degrades naphthalene and reduces hexavalent chromium. *Bioresource Technology*, 207, 370-378.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.015>

Hug, D. H., & Hunter, J. K. (1974). Effect of Temperature on Histidine Ammonia-Lyase from a Psychrophile, *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 119(1), 92-97.

Itankar, N., & Patil, Y. (2014). Management of Hexavalent Chromium from Industrial Waste Using Low-cost Waste Biomass. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 133, 219-

224. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2014.04.187>

Jenkins, R., Barton, J., Bartzokas, A., Hesselberg, J., & Knutsen, H. M. (2002). The Global Tanning Industry: A Commodity Chain Approach. En *Environmental Regulation In The New Global Economy: The Impact on Industry and Competitiveness* (pp. 157-172).

Edward Elgar Publishing Ltd. <https://doi.org/10.4337/9781781950418>

Kang, C., Wu, P., Li, Y., Ruan, B., Zhu, N., & Dang, Z. (2014). Estimates of heavy metal tolerance and chromium (VI) reducing ability of *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC

AB93066: Chromium (VI) toxicity and environmental parameters optimization. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 30(10), 2733-2746.

<https://doi.org/10.1007/s11274-014-1697-x>

- Kang, C., Wu, P., Li, Y., Ruan, B., Li, L., Tran, L., Zhu, N., & Dang, Z. (2015). Understanding the role of clay minerals in the chromium(VI) bioremoval by *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB93066 under growth condition: Microscopic, spectroscopic and kinetic analysis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 31(11), 1765-1779. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1928-9>
- Kaur, H., & Kumar, A. (2014). Bioremediation of hexavalent chromium in wastewater effluent by *Pseudomonas putida* (MTCC 102). *International Journal of Research In Earth & Environmental Sciences*, 1(4), 18-24.
- Klein, S., Lorenzo, C., Hoffmann, S., Walther, J. M., Storbeck, S., Piekarski, T., Tindall, B. J., Wray, V., Nimtz, M., & Moser, J. (2009). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol. *Molecular Microbiology*, 71(3), 551-565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06562.x>
- Levina, A., & Lay, P. A. (2008). Chemical properties and toxicity of chromium(III) nutritional supplements. *Chemical Research in Toxicology*, 21(3), 563-571. <https://doi.org/10.1021/tx700385t>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, M., & Stahl, D. A. (2015). *Brock, Biología de los microorganismos* (15.<sup>a</sup> ed.). Pearson.

Mahmood, Q., Zheng, P., Hu, B., Jilani, G., Azim, M. R., Wu, D., & Liu, D. (2009). Isolation and characterization of *Pseudomonas stutzeri* QZ1 from an anoxic sulfide-oxidizing bioreactor. *Anaerobe*, 15(4), 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.03.009>

Mawgoud, Y. (2015). Enhancement of chromium removal from industrial effluent drain by *Pseudomonas fluorescens* SC106 and *Bacillus subtilis* SC106 consortia. *Romanian Biotechnological Letters*, 20, 10863-10870.

Mayta Mendoza, S. D., & Vela Espinoza, S. G. (2015). *Tratamiento biológico del cromo (VI) con Pseudomonas Putida en un biorreactor airlift de tubos concéntricos* [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional del Centro del Perú.

MINSA. (2016). *Vigilancia epidemiológica en Metales pesados Semana Epidemiológica N° 52 – 2016 (Al 31/12/2016)*. <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/teleconferencia/SE012017/03metales.pdf>

MINSA. (2019). *Vigilancia epidemiológica Exposición a metales pesados—Semana Epidemiológica N° 7 – 2019 (del 10 al 16 de febrero 2019)*. <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/teleconferencia/2019/SE082019/04.pdf>

MINAM. (2009). Normas de límites máximos permisibles del ministerio de producción. En *Compendio de normas relacionadas a calidad de aire* (pp. 146-153). <http://sial.segat.gob.pe/documentos/compendio-normas-relacionadas-calidad-aire>

Miranda Paz, K. X. (2019). *Efecto de diferentes concentraciones de Pseudomonas sp. En la biorreducción de cromo VI en agua residual de curtiembre de la provincia de Trujillo, 2017* [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional del Santa.

Montes, C., Altimira, F., Canchignia, H., Castro, Á., Sánchez, E., Miccono, M., Tapia, E., Sequeida, Á., Valdés, J., Tapia, P., González, C., & Prieto, H. (2016). A draft genome sequence of *Pseudomonas veronii* R4: A grapevine (*Vitis vinifera* L.) root-associated strain with high biocontrol potential. *Standards in Genomic Sciences*, 11, 76.  
<https://doi.org/10.1186/s40793-016-0198-y>

Munawaroh, H., Gumilar, G., Nandiyanto, A., Kartikasari, S., & Kusumawaty, D. (2017). Microbial reduction of Cr (VI) in to Cr (III) by locally isolated *Pseudomonas aeruginosa*. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 180, 1-7.  
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/180/1/012296>

Municipalidad Distrital de El Porvenir. (2019). *Presentación. El Distrito de El Porvenir*.  
<https://www.muniporvenir.gob.pe/presentacion/>

Murugavelh, S., & Mohanty, K. (2013). Isolation, identification and characterization of Cr(VI) reducing *Bacillus cereus* from chromium contaminated soil. *Chemical Engineering Journal*, 230, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.049>

Narayani, M., & Shetty, K. (2013). Chromium-Resistant Bacteria and Their Environmental Condition for Hexavalent Chromium Removal: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43, 1009 - 955.

Neil, D. A., & Cortez Suárez, L. (2018). *Procesos y fundamentos de la Investigación Científica* (1.<sup>a</sup> ed.). UTMACH.

Noble, R. C., & Overman, S. B. (1994). *Pseudomonas stutzeri* infection a review of hospital isolates and a review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 19(1), 51-56. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(94\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0732-8893(94)90051-5)

Nweke, C. & Okpokwasili, G. (2010). Influence of exposure time on phenol toxicity to refinery wastewater bacteria. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 2(2), 20-27.

Ozturk, S., Kaya, T., Aslim, B., & Tan, S. (2012). Removal and reduction of chromium by *Pseudomonas* spp. And their correlation to rhamnolipid production. *Journal of Hazardous Materials*, 231-232, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.06.038>

Patil S, T. M. (2015). Antimicrobial Sensitivity Pattern of *Pseudomonas fluorescens* after Biofield Treatment. *Journal of Infectious Diseases & Therapy*, 03(03). <https://doi.org/10.4172/2332-0877.1000222>

Pavesi, T., & Moreira, J. C. (2020). Mechanisms and individuality in chromium toxicity in humans. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 40(9), 1183-1197.

<https://doi.org/10.1002/jat.3965>

Pinedo Ochoa, R. S. (2012). *Impactos ambientales generados por la Curtiembre D-leyse, en el distrito de el Porvenir, provincia Trujillo, región La Libertad*. [Informe de práctica pre-profesional]. Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Poornima, K., Loganathan, K., Swadhini, S. P., Sathiavelu, M., & Sathiavelu.A. (2010).

Degradation of Chromium by Using a Novel Strains of *Pseudomonas* Species. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 2(4), 095-099. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000031>

Pure Earth. (2016). *The new report, "The World's Worst Pollution Problems 2016: The Toxics Beneath Our Feet*. <https://www.worstpolluted.org/2016-report.html>

Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Magaña, A., Meza-Carmen, V., Johnstone, L., Cervantes, C., &

Rensing, C. (2011). Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal resistance genes. *Plasmid*, 66(1), 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.03.002>

Ravello Alva, M. O. (2017). *Evaluación técnica-económica, al recuperar y reutilizar el cromo en efluentes de Curtiembres Rebaza, minimizando el impacto ambiental negativo* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional de Trujillo.

Rodríguez-Martínez, J.-M., Poirel, L., Al Naiemi, N., Debets-Ossenkopp, Y. J., & Nordmann, P. (2010). Characterization of fluoroquinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas stutzeri*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), 366-367. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp441>

Rosner, W. (1998). El Impacto Ambiental de las Curtiembres en Trujillo-Perú. *Revista Geográfica*, 124, 57-77.

Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J., & Huffnagle, G. B. (2014). Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 927-948. <https://doi.org/10.1128/CMR.00044-14>

SilvaTeam. (2015, mayo 15). *Curtición híbrida al cromo*. <https://www.silvateam.com/es/productos-y-servicios/productos-para-curtiembre/procesos-de-curtido-ecotan/curtici-n-h-brid-a-al-cromo.html>

Sonwani, R., Giri, B., Jain, P., Singh, R. S., & Rai, B. (2019). Biodegradation of hexavalent chromium by acclimatized *Pseudomonas putida*: Optimization and kinetic study. *Journal of Energy and Environmental*, 7, 1-4.

Shindhal, T., Rakholiya, P., Varjani, S., Pandey, A., Ngo, H. H., Guo, W., Ng, H. Y., & Taherzadeh, M. J. (2021). A critical review on advances in the practices and perspectives for the treatment of dye industry wastewater. *Bioengineered*, 12(1), 70-87. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1863034>

Silva Villanueva, J. L. (2011). *Rol de las ecotecnologías, tecnologías limpias y de tratamiento, en el control de la contaminación generada por las curtiembres de Trujillo-Perú* [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de Trujillo.

SUNASS. (2004). El agua potable. En *Análisis de la calidad del agua potable en las empresas prestadoras del Perú: 1995-2003* (pp. 13-18). TAREA GRÁFICA.

Urteaga Rojas, N. E., & Vergara Medina, G. A. (2009). *Aplicación de la biorremediación ambiental en la destoxificación de efluentes industriales de la curtiembre Curtipiel S.A - El Porvenir, La Libertad*. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional de Trujillo.

Tan, G., Xi, Y., Yuan, P., Sun, Z., & Yang, D. (2019). Risk factors and antimicrobial resistance profiles of *Pseudomonas putida* infection in Central China, 2010–2017. *Medicine*, 98(44), e17812. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017812>

- Tumolo, M., Ancona, V., De Paola, D., Losacco, D., Campanale, C., Massarelli, C., & Uricchio, V. F. (2020). Chromium Pollution in European Water, Sources, Health Risk, and Remediation Strategies: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(15), E5438. <https://doi.org/10.3390/ijerph17155438>
- Useche, M.C., Artigas, W., Queipo, B., Perozo, E. (2019). *Técnicas e instrumentos de recolección de datos cuali-cuantitativos* (1ª ed). Colombia: Gente Nueva.
- Venkatesan, G., & Subramani, T. (2019). Reduction of hexavalent chromium to trivalent chromium from tannery effluent using bacterial biomass. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 48(4), 528-534.
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., & Giovannetti, L. (2014). Molecular mechanisms of Cr (VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 633-659. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12051>
- Villamizar, S., Ferro, J. A., Caicedo, J. C., & Alves, L. M. C. (2020). Bactericidal Effect of Entomopathogenic Bacterium *Pseudomonas entomophila* Against *Xanthomonas citri* Reduces Citrus Canker Disease Severity. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1431. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01431>

Yao, Y., Hu, L., Li, S., Zeng, Q., Zhong, H., & He, Z. (2020). Exploration on the bioreduction mechanisms of Cr(VI) and Hg(II) by a newly isolated bacterial strain *Pseudomonas umsongensis* CY-1. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110850. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110850>

Wani, P., Wahid, S., Khan, M., Rafi, N., & Wahid, N. (2019). Investigation of the role of chromium reductase for Cr(VI) reduction by *Pseudomonas entomophila* isolated from Cr(VI) contaminated effluent. *Biotechnology Research and Innovation*, 3, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.04.001>

Zarei, M., Mohammadpour, H., Gharibi, D., & Pourmahdi Borujeni, M. (2020). Identification of *Pseudomonas jessenii* and *Pseudomonas gessardii* as the most proteolytic *Pseudomonas* isolates in Iranian raw milk and their impact on stability of sterilized milk during storage. *The Journal of Dairy Research*, 87(3), 368-374. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000709>

# ANEXOS

### ANEXOS 1

**Tabla 8.**

*Matriz de Consistencia*

Aplicación de <i>Pseudomonas spp.</i> para proponer una biorremediación del cromo por reducción en los efluentes de curtiembres del distrito El Porvenir, 2022								
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE ESTUDIO	POBLACIÓN	MUESTRA	
¿De qué manera se aplicaría <i>Pseudomonas spp</i> para remediar por biorreducción el cromo hexavalente presente en los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir, 2022?	Establecer una aplicación por <i>Pseudomonas spp</i> para biorremediar el cromo hexavalente en los efluentes de curtiembres el distrito El Porvenir, 2022, teniendo como base artículos de investigación	Implícita	<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>  Estado fisicoquímico de los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir  <b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>  Criterios de selección de una especie de <i>Pseudomonas</i>	Aguas residuales de desechos sólidos, líquidos y gaseosos procedentes de los procesos de curtido y adobo de cuero          Condiciones biológicas, físicas y químicas que permiten el crecimiento y desarrollo óptimo de las especies del género <i>Pseudomonas</i> para la reducción eficiente de Cr (VI) a Cr (III)	Descriptivo, con enfoque cuantitativo y diseño no experimental	Artículos originales relacionados a la biorreducción del Cr (VI) por las diferentes especies del género <i>Pseudomonas</i>	15 artículos originales, cuya selección se realizó mediante análisis documental y el método no probabilístico	
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS						
¿Cómo se encontrará el estado fisicoquímico actual de los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir?	Diagnosticar las <b>condiciones fisicoquímicas</b> en la que se encuentran los <b>efluentes de las curtiembres</b> del distrito El Porvenir comparando con los <b>límites máximos permisibles del Ministerio del Ambiente.</b>	Implícita						
¿Cuál será la especie idónea de <i>Pseudomonas</i> para biorremediar el cromo hexavalente de los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir?	Seleccionar la especie idónea del género <i>Pseudomonas</i> para biorremediar el cromo hexavalente de los efluentes de las curtiembres del distrito El Porvenir.							
¿Cómo se desarrollará la propuesta técnica ambiental para biorremediar por reducción el cromo hexavalente de los efluentes de las Curtiembres del distrito El Porvenir, 2022	Plantear una propuesta técnica ambiental para biorremediar por reducción el cromo hexavalente de los efluentes de las Curtiembres del distrito El Porvenir, 2022							

**Tabla 9.**

*Matriz de Operacionalización de las Variables*

Aplicación de <i>Pseudomonas spp.</i> para proponer una biorremediación del cromo por reducción en los efluentes de curtiembres del distrito El Porvenir, 2022						
VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>  Estado fisicoquímico de los efluentes	Aguas residuales de desechos sólidos, líquidos y gaseosos procedentes de los procesos de curtido y adobo de cuero	Valores de los parámetros según los límites máximos permisibles establecidos por el MINAM	Condiciones físicas	Temperatura	Grados Celsius (°C)	Análisis documental y fichas de registro de datos
				Acidez/Alcalinidad		
<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>  Criterios de selección de una especie de <i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positivos, aeróbicos estrictos, aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones (anaeróbicos).	Condiciones biológicas, físicas y químicas necesarias para que una especie de <i>Pseudomonas</i> reduzca eficientemente el Cr (VI) a Cr (III)	Condiciones Biológicas	Especie	--	Análisis documental y fichas de registro de datos
				Tipo de aislado	--	
				Densidad celular	UFC/mL	
			Condiciones físicas	Temperatura	Grados Celsius (°C)	
				Acidez/Alcalinidad	pH	
				Tiempo	Horas	
				Oxígeno	Aeróbico, anaeróbico	
			Condiciones químicas	Donante de electrones	mg/L	
				Fuente de Carbono	mg/L	
				Fuente de Nitrógeno	mg/L	
Fuente de fósforo	mg/L					

## **ANEXO 2.**

### **PROPUESTA AMBIENTAL SOBRE EL USO DE *Pseudomonas* spp. PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE LOS EFLUENTES DE LAS CURTIEMBRES DEL DISTRITO EL PORVENIR**

#### **1. INTRODUCCION**

Las curtiembres en el Perú son reconocidas por generar residuos tóxicos altamente contaminantes, entre ellos el cromo, metal que recibe una gran atención por los efectos negativos sobre la biota y los seres humanos. Como parte de la gestión de los recursos hídricos, el tratamiento de las aguas residuales es una actividad clave para asegurar el acceso al agua y evitar el deterioro ambiental. A pesar de existir diferentes métodos físicos y químicos para su tratamiento, son poco los acogidos por sus altos costos y la complejidad de las tecnologías. Debido a las desventajas que presentan los tratamientos biológicos convencionales de aguas residuales, en recientes décadas los biorreactores Air lift ha recibido una mayor atención por parte de las industrias químicas y biotecnológicas. Estos muestran ventajas tales como una construcción simple y bajo consumo de energía, elevada proporción de transferencia de masa, momento y calor y menor daño mecánico para los microorganismos. En el Perú, pocos son los estudios que evalúan la eficiencia en biorreactores Air lift en aguas residuales industriales, las cuales presentan condiciones fisicoquímicas muy diferentes y extremas. Por lo tanto, el presente proyecto tiene como objetivo proponer un sistema de biorremediación en base al uso de *Pseudomonas* spp. y biorreactores Air lift para tratar las aguas residuales procedentes de curtiembres del distrito El Porvenir.

## 2. ANTECEDENTES

En México, Guzmán (2014) dispuso la creación de un biorreactor Air-lift a escala de laboratorio para el tratamiento de agua residual doméstica a través del uso de lodos activados. En el estudio se demostró que el biorreactor produjo un aumento de 44% del porcentaje de remoción de DQO y 32% más en sulfatos. De esta manera se comprobó que para tratar las aguas residuales domesticas a escalas de laboratorio es utilizando el reactor air lift con un tiempo de retención hidráulica de 24 horas.

En Huancayo-Perú, Mayta Mendoza & Vela Espinoza, (2015) realizó la evaluación de la capacidad de remoción de cromo (VI) por *P. putida* en un biorreactor Airlift de tubos concéntricos. Se construyó el biorreactor a escala laboratorio, y se trabajó con concentraciones iniciales de cromo (VI) de 7mg/L y 50mg/L usando dicromato de potasio, a una temperatura de 30°C, flujo de aire de 1 L/min y una cantidad inoculada de bacterias fue de 10<sup>4</sup> UFC/mL. Se encontró una remoción de cromo (VI) de 96,8 % a los 7 días de operación en el tratamiento de 7 mg/L y un 98,62 % a los 26 días de operación en los tratamientos de 50 mg/L.

Por último, Ángeles (2018) trató los efluentes orgánicos de la Industria alimentaria mediante un sistema compuesto por un biorreactor UASB empacado con un consorcio de bacterias anaerobias y un biorreactor AIRLIFT (reactor de puente aéreo). La aplicación del sistema mixto anaerobio-fúngico dio como resultado la decoloración de los efluentes de la industria alimentaria en 82.73%, además de la disminución del 86.98 % de la DBO y la disminución de 67.21 % en la DQO a los 24 días de evaluación.

### 3. MARCO LEGAL

En el Perú, la normativa ambiental que se aplica en el monitoreo de efluentes o aguas residuales industriales y del sector curtiembre se detalla en lo siguiente (ANA, 2011):

- Ley 28611 Ley General del Ambiente, la cual establece los principios y normas básicas para asegurar el efectivo ejercicio del derecho a un ambiente saludable, equilibrado y adecuado para el pleno desarrollo de la vida, así como el cumplimiento del deber de contribuir a una efectiva gestión ambiental y contribución a la protección del ambiente, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de la población y lograr el desarrollo sostenible del país.
- Ley N° 29338 - Ley de Recursos Hídricos, ley que regula el uso y gestión de los recursos hídricos. Comprende el agua superficial, subterránea, continental y los bienes asociados a esta. Se extiende al agua marítima y atmosférica en lo que resulte aplicable.
- D. S. N° 001-2015-VIVIENDA: modifican diversos artículos del Decreto Supremo N° 021-2009 VIVIENDA, que aprobó los Valores Máximos Admisibles (VMA) de las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario, así como de su Reglamento, aprobado mediante Decreto Supremo N° 003-2011 VIVIENDA y modificado por el Decreto Supremo N° 010-2012-VIVIENDA

- D.S. N° 021-2009-VIVIENDA, se aprobaron los Valores Máximos Admisibles (VMA).
  
- D.S. N°002-2008 MINAM Aprueban Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua.
  
- D.S. N° 003-2002-PRODUCE Aprueban límites máximos permisibles y valores referenciales para las actividades industriales de cemento, cerveza, curtiembre y papel.
  
- D.S. N° 017-2015-PRODUCE Reglamento de Gestión Ambiental para la Industria Manufacturera y Comercio Interno.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

- Proponer un sistema de biorreducción para los efluentes de las Curtiembres del distrito El Porvenir en base al uso de *Pseudomonas putida* como agente biorreductor de cromo hexavalente.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el estado actual de las condiciones fisicoquímicas de los efluentes contaminados con cromo hexavalente de las Curtiembres del distrito El Porvenir.
- Proponer un prototipo de biorreactor del tipo Air-lift a escala de laboratorio para la biorreducción de los efluentes contaminados con cromo hexavalente de las Curtiembres del distrito El Porvenir, usando *P. putida*.
- Detallar las especificaciones técnicas y económicas del sistema de biorreducción para el funcionamiento de biorreactor del tipo Air lift a escala de laboratorio para la biorreducción de los efluentes contaminados con cromo hexavalente de las Curtiembres del distrito El Porvenir, usando *P. putida*.

## 5. LOCALIZACIÓN DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

El presente proyecto será realizado en la Universidad Privada del Norte, en la sede ubicada en la Urbanización San Isidro, Calle 31, 2 etapa del distrito de Trujillo, provincia de Trujillo, departamento de La libertad, en Perú.

## 6. ZONA DE ESTUDIO

La zona de estudio estará conformada por 3 curtiembres cercanas entre sí del distrito El Porvenir. Estas se escogieron en base a su accesibilidad y situación actual de trabajo.

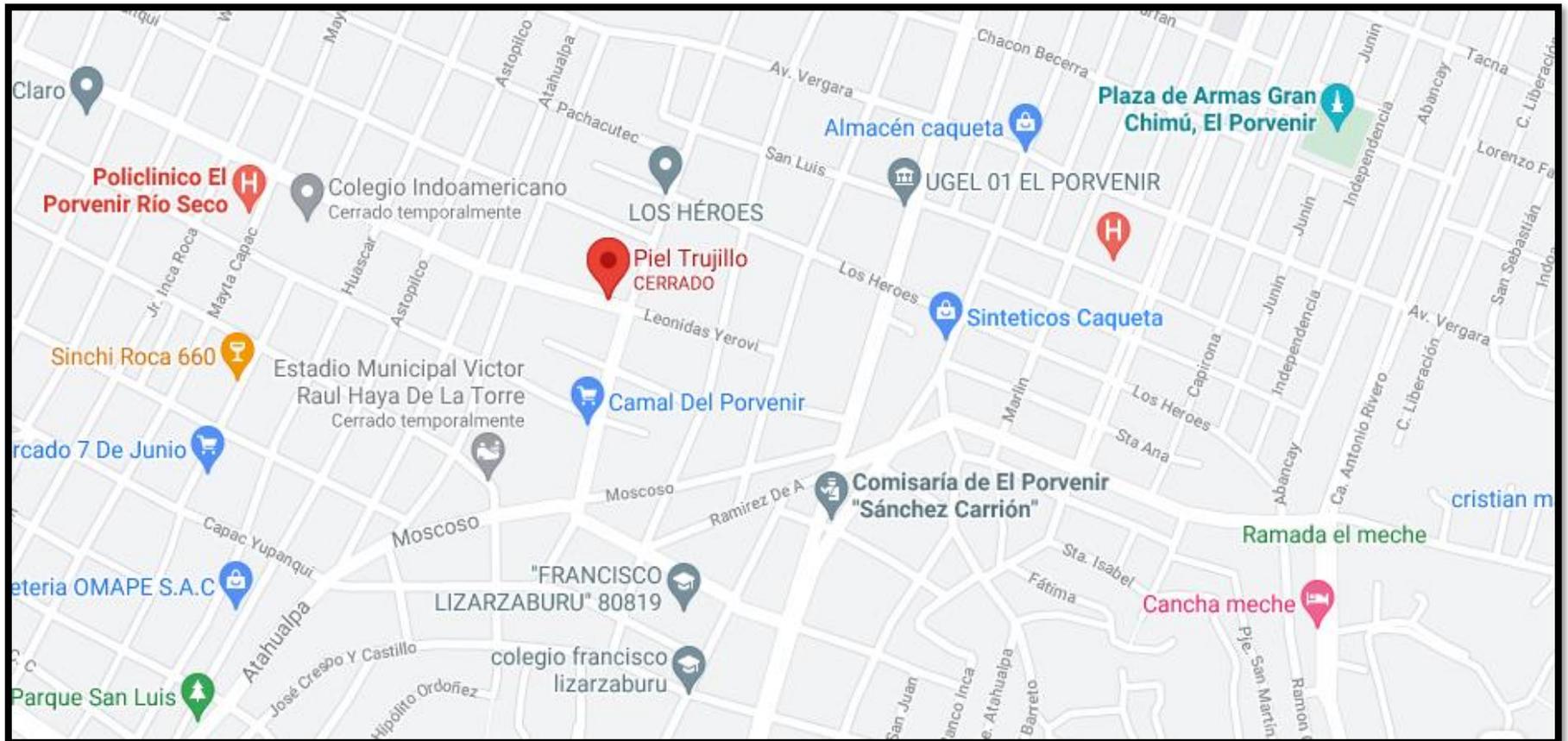
**Tabla 10.**

*Datos de las Curtiembres de estudio*

LOCAL	UBICACIÓN	RUC	Estado
<b>Curtiembre Piel Trujillo S.A.C</b>	Jr. Leónidas Yerovi 350	20480943920	Activo
<b>Curtiduría León de Juda E.I.R.L</b>	Hipólito Unanue 582 - Río Seco El Porvenir	20393758695	Activo

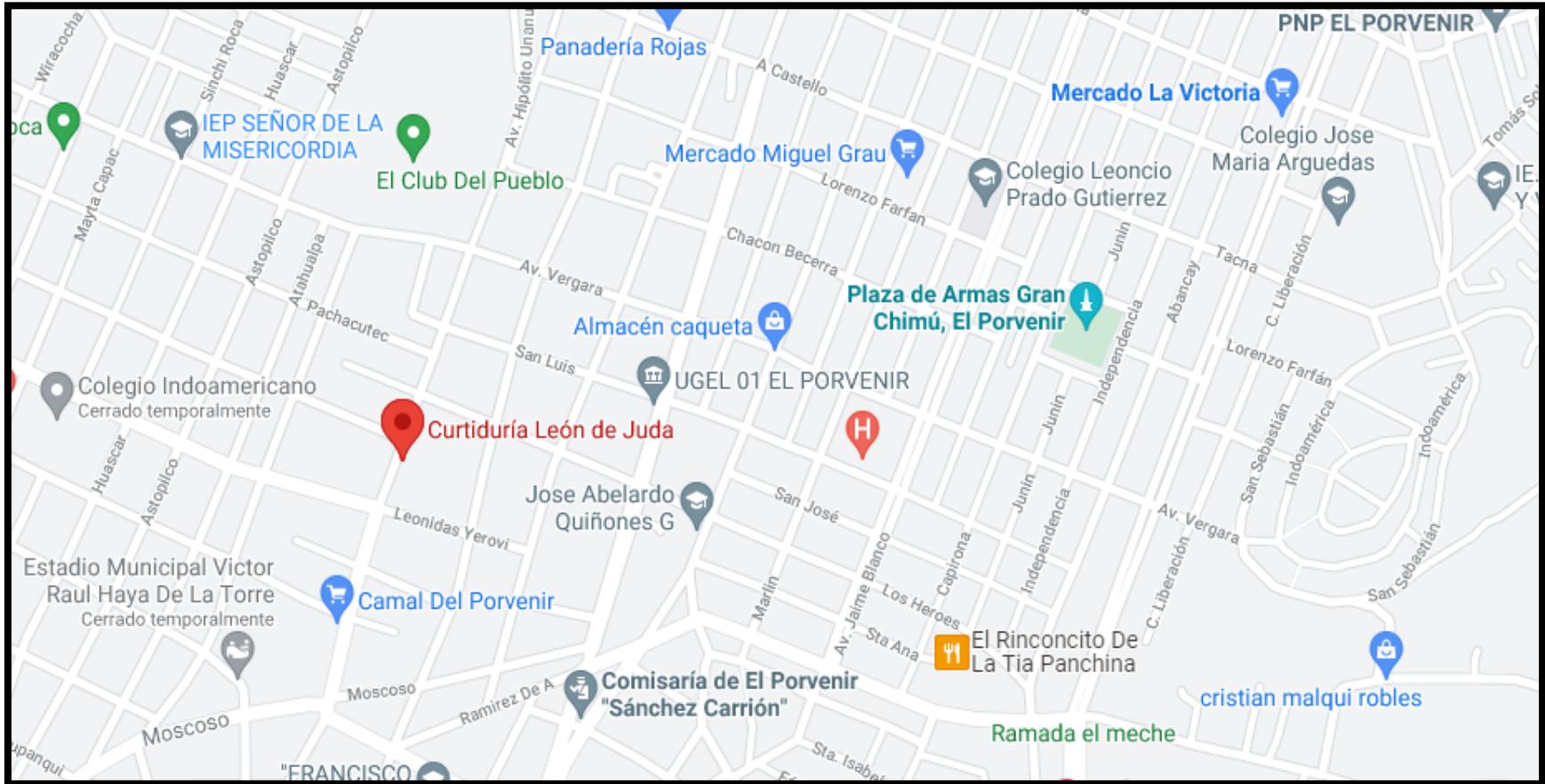
**Figura 6.**

*Ubicación geográfica de la Curtiembre Piel de Trujillo S.A.C en el distrito El Porvenir*



**Figura 7.**

*Ubicación geográfica de la Curtiduría León de Juda S.A.C en el distrito El Porvenir*



## 7. Diagnóstico FODA de las curtiembres del distrito El Porvenir

A través de visitas frecuentes a las curtiembres y entrevistas realizadas al personal de operación de la empresa (Anexo 2), se realizó un diagnóstico situacional FODA con relación al manejo de los efluentes de las curtiembres, resumiendo las DEFICIENCIAS encontradas con respecto al tratamiento de sus aguas residuales en lo siguiente:

- Las curtiembres en evaluación solo emplean operaciones básicas de tipo físico y químico para tratar sus efluentes, tales como desbaste y sedimentación, para eliminar los sólidos suspendidos y sedimentables que se encuentran en el agua residual, mediante tratamientos como, sedimentación, coagulación-floculación y neutralización.
- Las curtiembres en estudio no emplean agentes químicos como sulfato ferroso para reducir el Cr (VI) a Cr (III), que posteriormente puede ser precipitado por hidróxido de sodio. Asumen que el sulfato ferroso vuelve oscuro el agua residual y dificulta su tratamiento químico posterior.
- Las curtiembres en estudio cuentan con 3 a 4 cubas para la fase de curtido, emitiendo un aproximado de 50 m<sup>3</sup> de aguas residuales a la semana, las cuales son almacenadas en grandes tanques para su traslado posterior por empresas o son vertidas directamente al drenaje.

- Los representantes de las curtiembres en estudio indican que los tratamientos biológicos son ineficaces debido al costo de producción y al personal que se necesita para establecerlo. Ellos aluden de que los tratamientos químicos son mejores y más fácil de manejar.
  
- Los representantes de las curtiembres en estudio indican que para la remoción del Cr (VI) utilizan sulfato de aluminio en una coagulación convencional seguido por filtración. Sin embargo, ellos desconocen que el Cr (VI) no es removido por estos agentes debido a que los iones cromato y dicromato son extremadamente solubles en el agua residual.
  
- Los representantes de las curtiembres en estudio indican que cumplen con los requerimientos de los límites máximo permisibles (LMP) según lo estipulado por el marco legal en sus aguas residuales. Sin embargo, no cuentan o no muestran los documentos o estudios que avalen algún monitoreo mensual sobre la naturaleza fisicoquímica de las aguas residuales.

**Figura 8.**

*Infraestructura y operación de la Curtiembre León de Juda S.A.C*



## **8. Plan de trabajo**

### **8.1 Caracterización fisicoquímica de las aguas residuales de las Curtiembres del Distrito El Porvenir**

#### **8.1.1 Obtención de muestras de las aguas residuales provenientes de las Curtiembres del Distrito El Porvenir**

En primera instancia, la presente propuesta plantea un monitoreo de la naturaleza fisicoquímica de los efluentes de las curtiembres. Esto se realizará a través de muestreos semanales de los drenajes, lo cual serán transportados al laboratorio para su respectivo análisis. La obtención de las muestras, su preservación y su custodia serán realizados según lo estipulado por el Protocolo de Monitoreo de la Calidad de los Efluentes de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales de la Oficina del Medio Ambiente (OMA, 2013).

Las muestras serán recolectadas y preservadas teniendo en cuenta lo establecido en la Tabla 9. Los frascos deben ser debidamente etiquetados y rotulados antes de la toma de muestra con los siguientes datos: Nombre del punto de monitoreo, número de muestra, Fecha y hora de la toma de muestra, preservación realizada, tipo de reactivo de preservación utilizado. Además, llenar el formato de cadena de custodia. Las muestras de agua residual deben colocarse en una caja de almacenamiento térmica con refrigerante (ice pack), para cumplir con la recomendación de temperatura.

**Tabla 11.**

*Consideraciones para la toma de muestra y preservación del agua residual de las Curtiembres*

Parámetro	Tipo de recipiente	Volumen mínimo de muestra	Preservación/conservación	Tiempo máximo de duración
Temperatura	Plástico, vidrio	1000 mL	No es posible	15 minutos
pH	--	50 mL	No es posible	--
DBO <sub>5</sub>	Plástico, vidrio	1000 mL	Refrigerar a 4°C	48 horas
DQO	Plástico, vidrio	100 mL	Analizar lo más pronto posible, o agregar H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> hasta pH	28 días
Aceites y grasas	Vidrio ámbar boca ancha	1000 mL	Agregar HCL hasta pH	28 días
Solidos suspendidos totales	Plástico, vidrio	100 mL	Refrigerar a 4°C	7 días
Metales pesados (Cromo)	Plástico	100 mL	Agregar HNO <sub>3</sub> hasta pH < 2	2 meses
Coliformes Termotolerantes (NMP)	Vidrio esterilizado	250 mL	Refrigerar a 4°C Agregar tiosulfato en plantas con cloración	6 horas

**Fuente:** Protocolo de monitoreo de la calidad de los efluentes. Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS)

### **8.1.2 Determinación de los parámetros fisicoquímicos de las aguas residuales de las Curtiembres del Distrito El Porvenir**

La determinación de los parámetros fisicoquímicos como pH, temperatura, DBO<sub>5</sub>, DQO, aceites y grasas, sólidos suspendidos totales y la presencia de ciertos metales pesados como el cromo, arsénico, plomo, etc., en las aguas residuales de las curtiembres se realizará en el Laboratorio Regional del Agua, la cual se encuentra acreditado por el Instituto Nacional de Calidad (INACAL).

Según la American Public Health Association (APHA), la American Water Works Association (AWWA) y la Water Environment Federation (WEF) (2012), la determinación de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos se realizará en base a los "Métodos Estándar para el Examen de Agua y Aguas Residuales" los cuales fueron aprobados por las organizaciones antes mencionadas, los cuales representan metodologías de análisis de calidad del agua. Los laboratorios acreditados cuentan con gran parte de equipamiento analítico necesario para llevar a cabo estos análisis (absorción atómica, espectrofotometría, cromatografía, colorimetría, etc.) debido a las necesidades existentes en los exámenes de muestras de aguas y otros.

### 8.1.3 Evaluación de los parámetros fisicoquímicos de las aguas residuales de las Curtiembres del Distrito El Porvenir según los valores máximos admisibles

Los resultados de las aguas residuales de las curtiembres se compararán con los Límites Máximos Permisibles (LMP) y Valores Referenciales aplicables por la Autoridad Competente, a las actividades industriales manufactureras de cemento, cerveza, curtiembre y papel (Tabla 10).

**Tabla 32.**

*Límites Máximos Permisibles para el sector curtiembre*

PARAMETROS	UNIDAD DE MEDIDA	LMP
pH		6 – 9
Temperatura	°C	<35
Solidos Suspendidos Totales	mg/L	500
Aceites y grasas	mg/L	50
DBO5	mg/L	500
DQO	mg/L	1500
Sulfuros	mg/L	3
Cromo VI	mg/L	0.4
Cromo total	mg/L	2
N-NH4	mg/L	30
Coliformes fecales	NMP/100 ml	-

Fuente: D.S. 003-2002-PRODUCE

## 8.2 Preparación del inóculo de *Pseudomonas putida* cromo resistente para el sistema de biorremediación de los efluentes de las Curtiembres del Distrito El Porvenir.

### 8.2.1 Aislamiento de *Pseudomonas sp.* cromo resistente de los efluentes de las Curtiembres del Distrito El Porvenir.

Las bacterias del género *Pseudomonas* se aislaron en agar Cetrimide (Guerra et al., 2011). Para esto, se tomarán alícuotas de las muestras diluidas al  $10^{-6}$  y se sembrarán mediante la técnica de agotamiento y estría en agar Cetrimide suplementadas con cromo Cr (VI) en forma de dicromato de potasio a 100 mg/L, incubándose en aerobiosis a 30°C, durante 48 horas y seleccionándose las colonias pigmentadas y no pigmentadas. En la siguiente tabla se detalla los componentes del Agar Cetrimide que se utilizarán.

**Tabla 43.**

*Componentes y cantidades del Agar Cetrimide*

COMPONENTES	CANTIDADES
Peptona de gelatina	20,0 g/L
Sulfato de potasio	10,0 g/L
Cloruro de magnesio	1,4 g/L
Cetrimida	0,3 g/L
Glicerol	10,0 mL
Agar	13,6 g/L
Agua destilada	1000 mL

### 8.2.2 Aislamiento y caracterización fenotípica de *Pseudomonas putida* cromo resistente

La identificación fenotípica entre las diferentes especies del género *Pseudomonas* (Holt et al., 1994; Alvarado & Valderrama, 2014) se realizará mediante la técnica de tinción de Gram y diferentes pruebas bioquímicas y crecimientos a temperaturas de 42°C y 4°C. La diferenciación entre las especies de *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens* se realizará según lo descrito en el siguiente cuadro:

**Tabla 54.**

*Diferenciación de las pruebas bioquímicas entre las especies de P. aeruginosa, P. putida y P. fluorescens*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Oxidasa	+	+	+
Producción de Fluoresceína (agar F)	+	-	+
Producción de piocianina (agar P)	+	-	+
Prueba de licuefacción de gelatina	+	-	+
Crecimiento a 4°C	+	+	
Crecimiento a 42°C	-	-	+

Nota: +/- crecimiento y / o actividad bacteriana

### **8.2.3 Mantenimiento de cultivos de *P. putida* cromo resistente**

Los cultivos puros de *Pseudomonas putida* identificados se sembrarán en agar tripticasa soya (TSA) durante 24 horas y se mantendrán bajo refrigeración (8°C) hasta su posterior uso, realizándose subcultivos cada 30 días.

### **8.2.4 Evaluación de la capacidad de tolerancia al cromo hexavalente de los aislados de *P. putida***

Se determinará la concentración mínima inhibitoria (CMI) del cromo hexavalente sobre el crecimiento de los aislados de *Pseudomonas putida*. Para esto, el cultivo que crecerá en agar TSA a una concentración de 100 mg/L de cromo se transferirá a cultivos con concentraciones más altas como 200 mg/L, 400 mg/L, 600 mg/L, 800 mg/L, 1000 mg/L y 1200 mg/L. Se determinará el CMI en placas donde no exista crecimiento, incluso después de 48 h de incubación (Nokman et al, 2019).

### **8.2.5 Evaluación de la capacidad de tolerancia de los aislados de *P. putida* a otros metales pesados**

Del aislado cromo resistente de *P. putida* obtenido de la prueba anterior se determinará su resistencia a otros metales pesados presentes en los efluentes como el plomo, cobre, aluminio y titanio. La concentración de estos metales pesados en la prueba será de 200 mg/L y 400 mg/L (Nokman et al, 2019).

### **8.2.6 Evaluación de la sensibilidad y el patrón de resistencia de *Pseudomonas putida* a los antibióticos**

Del aislado de *P. putida* obtenido de la prueba anterior se determinará su susceptibilidad a antibióticos mediante el método de difusión de pocillos de Kirby Bauer en agar TSA. Se utilizarán antibióticos como ampicilina, estreptomicina, ácido nalidíxico y penicilina en discos de 20 µg, los cuales se colocarán en placas de agar y se incubarán a 30 °C durante 24 h, midiéndose el halo de inhibición (Nokman et al, 2019).

### **8.2.7 Determinación de la cinética de crecimiento de la cepa de *P. putida* resistente a metales pesados en presencia de metales pesados.**

Del aislado de *P. putida* obtenido de la prueba anterior se estudiará su cinética de crecimiento en agar TSA suplementadas con 400 mg/L de metales pesados como cromo, plomo, cobre, aluminio y titanio. El crecimiento se determinará mediante absorbancia a 600 nm en diferentes intervalos de tiempo. Se considerará como control el cultivo bacteriano sin la adición de metales pesados (Nokman et al, 2019).

### **8.2.8 Caracterización molecular de *P. putida* cromo resistente**

Opcionalmente, se realizará una caracterización molecular del aislado *P. putida* cromo resistente y susceptible a antibióticos mediante técnicas como la PCR del gen bacteriano 16SrRNA (Nokman et al, 2019).

### 8.2.9 Preparación del inóculo de *Pseudomonas putida* para uso en el biorreactor

A partir de la cepa aislada de *P. putida*, se preparó una suspensión en solución salina fisiológica estéril, similar al tubo N° 1 del Nefelómetro de Mac Farland (concentración aproximada  $3 \times 10^8$  células/mL), a partir del cual se prepararon 200 mL de una dilución al 1/100 (aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/mL). Se ha preparado el medio de cultivo para la siembra de las bacterias *P. putida* en medio líquido.

**Tabla 65.**

*Medio de cultivo para Pseudomonas putida para 3,7 L y 1 L*

REACTIVO	PARA 1 L (G)	PARA 3,7 L (G)
Agar	14	-
$C_6H_{12}O_6$	16,56	61,27
$(NH_4)_2SO_4$	2,83	10,47
$Na_2HPO_4$	0,27	1,00
$K_2HPO_4$	0,59	2,18
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,20	0,74
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25	0,93
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0039	0,0145
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,0020	0,0075

### **8.3 Construcción de un sistema de biorremediación para aguas residuales contaminadas con cromo hexavalente de las curtiembres del distrito El Porvenir usando *P. putida***

#### **8.3.1 Criterios para la construcción del biorreactor**

Se construirá un biorreactor Air lift de tubos concéntricos para el desarrollo de esta propuesta ambiental. Para su construcción, es importante seleccionar materiales que puedan soportar repetidos ciclos de esterilización por vapor, y que estos materiales no interfieran con el proceso metabólico.

Como se plantea un prototipo de biorreactor del tipo Air-lift a escala de laboratorio, es posible utilizar vidrio y/o acero inoxidable. El vidrio es útil porque no es tóxico, proporciona superficies lisas y es resistente a la corrosión. Tomando en cuenta que el equipo debía ser caracterizado hidrodinámicamente, la siguiente propuesta opta por construir una de vidrio, ya que brinda facilidad de limpieza y transparente.

Las dimensiones del biorreactor se determinaron tomando en cuenta que la relación altura/diámetro debía ser entre cuatro y seis (Chisti y Moo-Young, 2002), considerando un volumen de aproximadamente cinco litros. Pensando en trabajos futuros, se propone colocar en la tapa cinco entradas, dos con tapones de roscas que pueden servir para colocar electrodos medidores de oxígeno disuelto y pH; otros dos sin tapa en los que puedan introducirse

termómetros o sirvan como entrada de líquidos y el último, localizado en el centro, para la introducción del agitador.

Se decidió colocar en la construcción cuatro llaves de entrada o salida en el cuerpo, para que se pueda trabajar también en modo semicontinuo o continuo. Además, para el suministro de oxígeno se optó por utilizar un difusor de placa y colocarlo en la base junto con una entrada de aire.

Para unir las tres partes del biorreactor, se optó por emplear cuatro bridas de acrílico, empaques de neopreno, tornillos y tuercas para ajustarlas. La brida que se encuentra en la parte superior de la tapa se diseñó como una sola pieza, de tal modo que ejerce una mayor presión entre ésta y el cuerpo de la base. Las otras tres fueron partidas por la mitad, ya que los bordes del biorreactor permiten sólo la entrada lateral en el cuerpo y la base.

### 8.3.2 Características del Biorreactor

A continuación, se detalla el cálculo de las medidas para realizar la construcción del biorreactor, se partió a partir del diámetro interior del tubo externo del reactor para la realización de los cálculos.

Determinación del diámetro del tubo interno del reactor:

Para determinar el diámetro del tubo interno del biorreactor usaremos

$$D_d = 0,08\text{m}$$

Remplazando en la ecuación (1.11):

$$D_r = 0,6D_d$$

$$D_r = 0,7(0,08 \text{ m}) = 0,056 \text{ m}$$

Determinando la longitud del tubo interior a partir de las relaciones de la tabla 1.2

Se utilizó las relaciones utilizadas por Cheng - Shing y Shyh - Jye, 2004

$H_{TI}$ : Altura del tubo interior

$H_L$ : Altura del líquido

$$H_{TI}$$

$$H_L$$

$$= 0,78$$

$$H_{TI} = 0,78 \times H_L$$

$$H_{TI} = 0,81 \times 0,75 \text{ m}$$

$$HTI = 0,648 \text{ m} \approx 0,65 \text{ m}$$

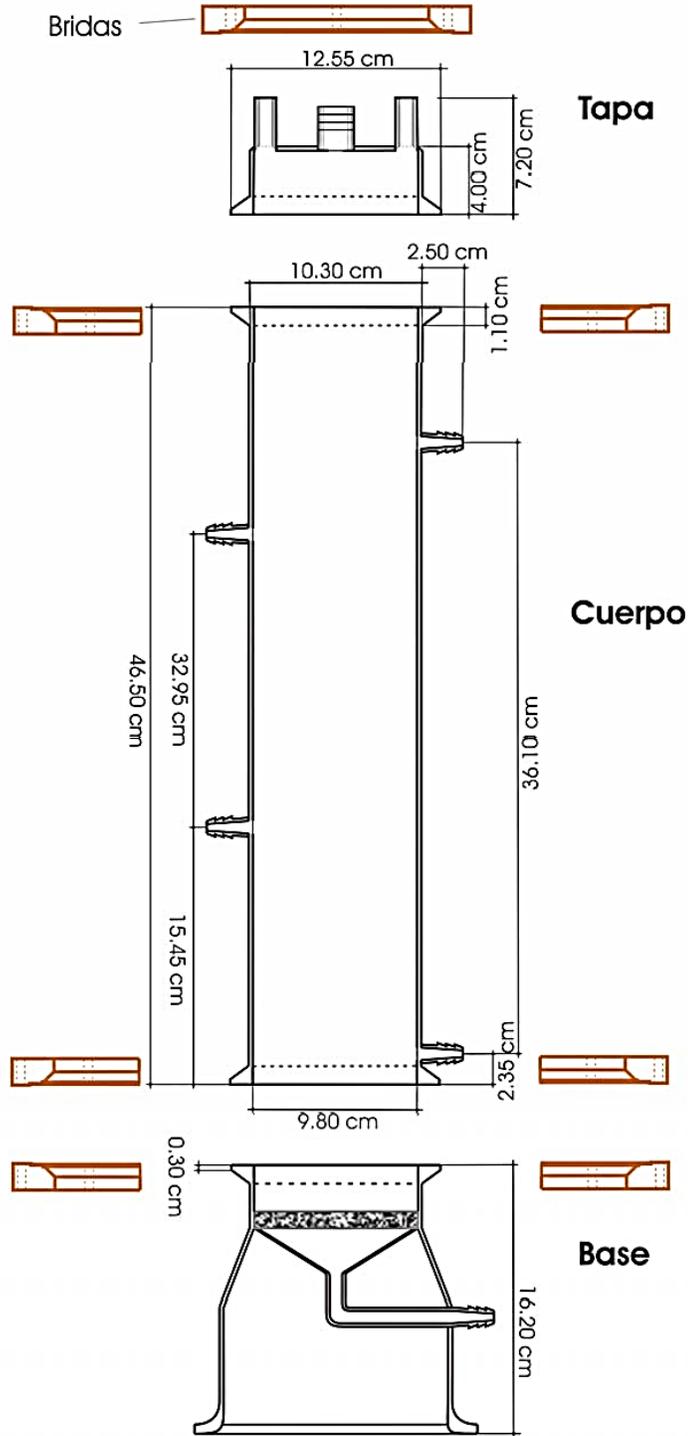
**Tabla 76.**

*Especificaciones técnicas del biorreactor Airlift*

<b>Biorreactor Airlift</b>	
<b>Material</b>	De Vidrio
<b>Modelo</b>	Tubos concéntricos
<b>Dimensiones</b>	
<b>Diámetro tubo exterior</b>	0,09m
<b>Diámetro del Tubo Interior</b>	0,056 m
<b>Longitud del Tubo interior</b>	0,65 m
<b>Altura Total del Reactor</b>	0,98 m
<b>Altura del Líquido</b>	0,821m
<b>Fondo</b>	0,116m
<b>Separador</b>	0,076 m
<b>Soporte del biorreactor</b>	
<b>Modelo</b>	Tipo Mesa
<b>Material</b>	Acero Inoxidable
<b>Dimensiones</b>	
<b>Altura del piso a la base</b>	0,790 m
<b>Longitud entre patas (ancho)</b>	0,725 m
<b>Medida de la plataforma que soporta el biorreactor</b>	0,270 m × 0,270 m

**Figura 9.**

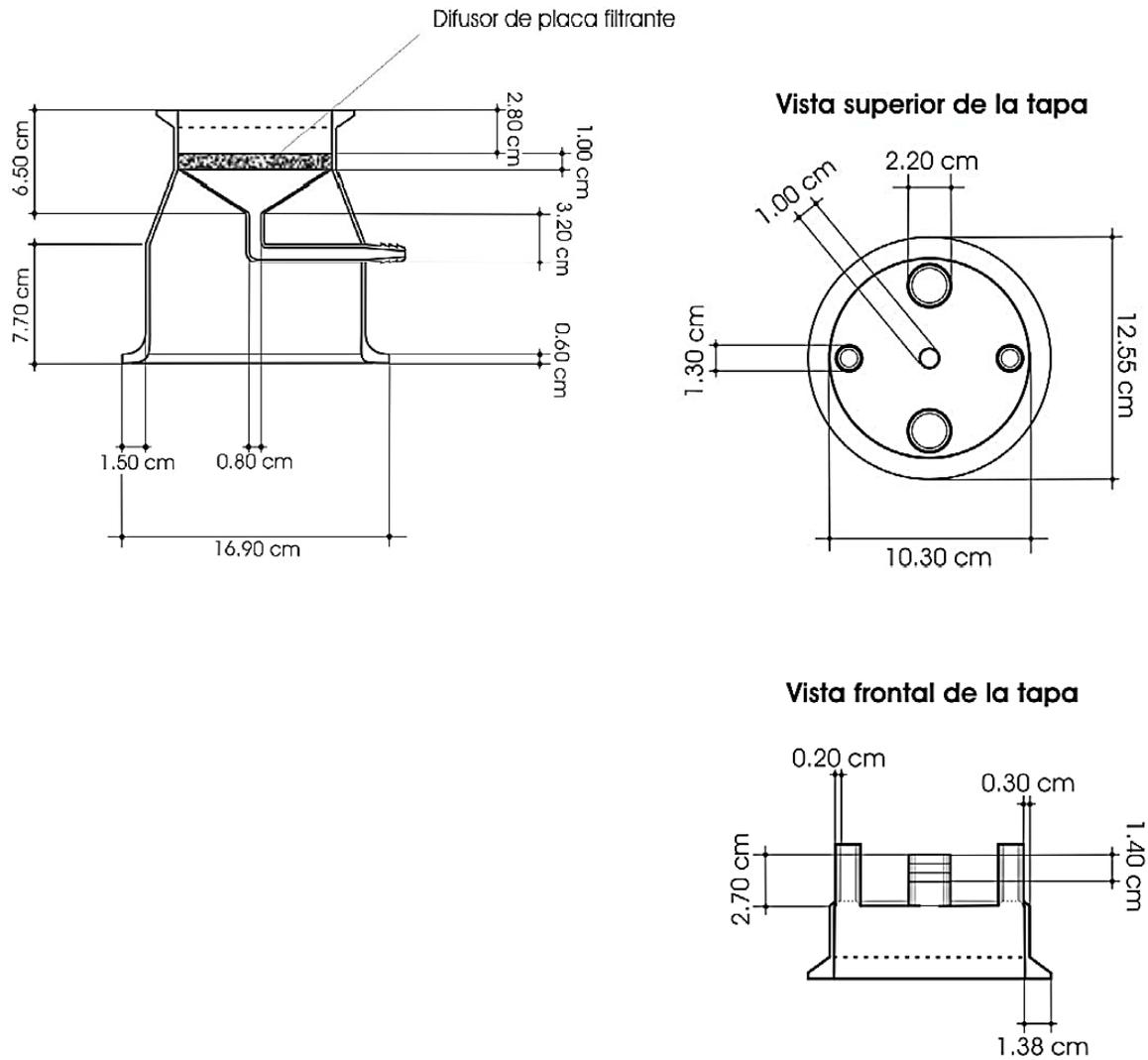
*Construcción de un Biorreactor air-lift adaptado de Guevara (2004)*



**Fuente:** Adaptado de Mayta Mendoza & Vela Espinoza, (2015)

**Figura 10.**

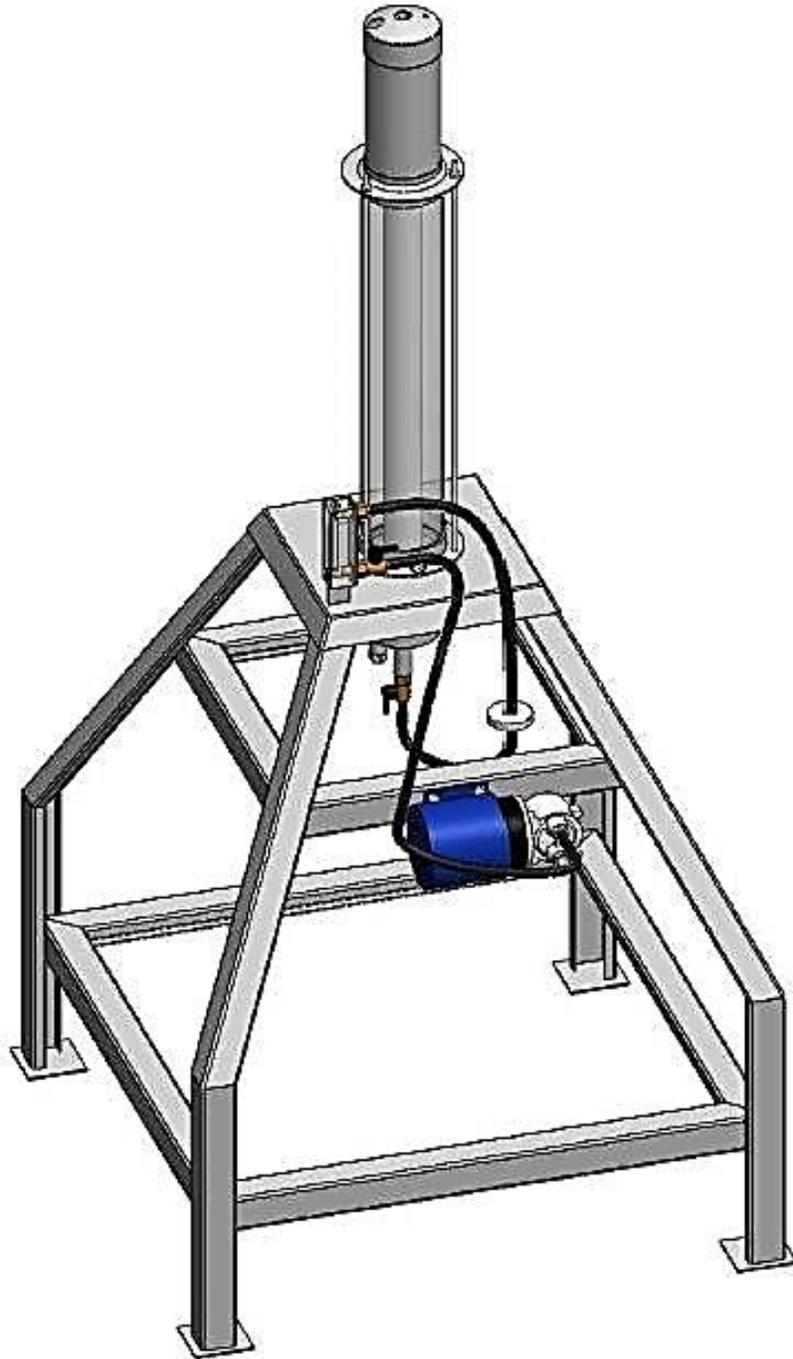
*Construcción de un Biorreactor Air-lift adaptado de Guevara (2004)*



**Fuente:** Adaptado de Mayta Mendoza & Vela Espinoza, (2015)

**Figura 51.**

*Soporte para el Biorreactor Airlift de tubos concéntricos*



**Fuente:** Adaptado de Mayta Mendoza & Vela Espinoza, (2015)

## **8.4 Operación del sistema de biorremediación usando *P. putida* para las aguas residuales contaminadas con cromo hexavalente de las curtiembres del distrito El Porvenir**

### **8.4.1 Pretratamiento al agua residual de la curtiembre**

Antes de que las aguas residuales de las curtiembres se coloquen en el biorreactor, se procederá a realizar una filtración a través de una malla de 80  $\mu\text{m}$  y una tela hecha de algodón con micronizado de polipropileno con la finalidad de impedir el paso de los sólidos y la mayor parte de grasa de la materia prima.

### **8.4.2 Ensayos previos a la biorremediación**

Antes de poner en marcha el sistema de biorremediación, se realizará algunos unos ensayos con *P. putida* en matraces con agua residual sin esterilizar con su pH natural para obtener los parámetros óptimos de crecimiento bacteriano, tiempo y agitación, remoción de cromo, etc. que puedan ser aplicados posteriormente al biorreactor. En matraces Erlenmeyer se trabajará con medios de nutrientes suplementados (S) [p / v, 0,5% de glucosa, 0,5% de extracto de levadura y 0,5% de peptona] y se incubarán a 30 °C previamente optimizados durante 120 h en un agitador incubadora (150 rpm). El crecimiento bacteriano, la decoloración, la decloración, la eliminación de  $\text{Cr}^{6+}$  y el cambio de pH del efluente se medirán periódicamente en un intervalo de 24 h hasta 120 h de incubación.

### 8.4.3 Biorremediación en biorreactor Air lift

En el biorreactor Air lift diseñado se colocarán en condiciones asépticas: 3350 mL de agua residual de curtiembre, 400 mL de inóculo, 40 mL de solución de glucosa al 25%, 200 mL de peptona al 30%, 10 mL de solución de CaCl<sub>2</sub> al 32%, Luego se pondrá en funcionamiento el sistema durante 7 días. Para poner en marcha el sistema, se tendrá en cuenta los siguientes pasos:

- Lavar el biorreactor y materiales a usar y enjuagar los materiales y el reactor con agua destilada.
- Esterilizar el biorreactor, los materiales de vidrio 5 L de agua destilada en la mufla por 30 min a 180 °C.
- Esterilizar los materiales de plástico en la cámara de flujo laminar y el ambiente.
- Se procede al armado e instalación del biorreactor airlift de forma aséptica.
- Se conectará los tubos de goma para el aire, se encenderá la bomba de aire y se verterá el agua destilada esterilizada, el medio de cultivo en el biorreactor a 30°C.

- El biorreactor opera a 30 °C para ello tendrá un sensor de temperatura y una resistencia que transmite calor cada que haya variación en el set point. Se trabajará a un flujo de aire 1 L/min y en 15,6 psia.
  
- Se tomará una muestra de 1L del biorreactor y procederá a realizar diluciones hasta  $10^{-8}$  para el recuento inicial de las bacterias y se sembrará en placas Petri en medio sólido para el recuento por el método "Vertido en Placas".

#### **8.4.4 Determinación del cromo hexavalente final**

La determinación de los parámetros fisicoquímicos como pH, temperatura, DBO5, DQO, aceites y grasas y los niveles de cromo se realizará en laboratorios acreditados por INACAL bajos los métodos estándar de análisis. La determinación del cromo hexavalente final se realizará mediante el método colorimétrico se basa en la reacción del cromo hexavalente con 1,5-difenilcarbazida en medio ácido, el cual produce la formación de un compuesto desconocido de color rojo violeta. Éste puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm y la absorbancia es proporcional a la concentración de cromo en la muestra.

#### 8.4.5 Determinación de la cinética y eficiencia de biorreducción del cromo hexavalente por *Pseudomonas putida*

Para la determinación de la cinética de biorreducción se utilizará las concentraciones iniciales de Cr (VI) en mg/L de los efluentes de las curtiembres y se realizará la determinación en el sistema de biorremediación propuesto. Asimismo, se emplearán 2 controles positivos: uno con agua destilada y otro con el medio líquido, ambos con Cr (VI), sin inóculo. Además, se usará un sistema solo con el medio líquido estéril y sin Cr (VI) que servirá como blanco. Se recolectarán, de forma aséptica, alícuotas de 5 mL, a diferentes tiempos (h): 0, 24, 72, 120 o hasta obtener la máxima reducción de Cr (VI) para la medición espectrofotométrica de Cr (VI). También se medirá el pH de todas las muestras a lo largo del tiempo. Todas las cinéticas de biorreducción se realizarán por triplicado.

**Tabla 17.**

*Grupos experimentales de las cinéticas de biorreducción de Cr (VI)*

<b>Grupos</b>	<b>Componentes</b>	<b>Repeticiones</b>
Blanco	Medio de cultivo líquido	3
Control positivo 1	Medio + [Cr(VI)]	3
Control positivo 2	Agua destilada + [Cr(VI)]	3
Grupo experimental	Medio + [Cr(VI)] + <i>P. putida</i>	3

Todas las cinéticas de biorreducción obtenidas se ajustarán a un modelo polinomial de segundo grado (ec. 1) y la ecuación originada será derivada (ec. 2) a fin de determinar la tasa de biorreducción de Cr (VI) a Cr (III) correspondiente a la tasa máxima de utilización del sustrato

$$y = ax^2 - bx + c \quad (1)$$

$$\frac{dy}{dx} = 2ax - b \quad (2)$$

Donde:  $y$  = Concentración de Cr (VI)

$x$  = tiempo (h)

La tasa de biorreducción de Cr (VI) a Cr (III) se calculará a través del cálculo de la pendiente de la ecuación de la recta, para lo cual se utilizará la siguiente fórmula:

$$m = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad (3)$$

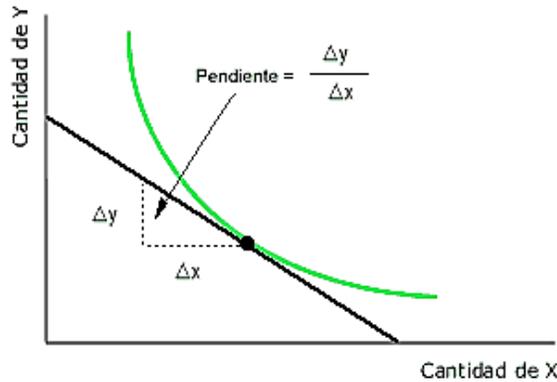
Donde:  $y_1$  = Concentración de Cr (VI) inicial

$y_2$  = Concentración de Cr (VI) final

$x_1$  = tiempo inicial (h)

$x_2$  = tiempo final (h)

Para la determinación de la tasa de biorreducción de Cr (VI) a Cr (III) se empleará la siguiente:



La eficiencia del proceso de biorreducción se calculó por medio del porcentaje de remoción con la Ecuación 2 (Torres, 2007).

$$\% = \frac{(C_o - C_f) \times 100}{C_o}$$

Dónde:

$C_o$  = Concentración inicial del Cr (VI) en mg/L

$C_f$  = Concentración del Cr (VI) en mg/L en disolución en función del tiempo

### 8.5 Cronograma de actividades

Tabla 88.

Cronograma de ejecución de actividades para el funcionamiento del sistema de biorremediación a escala de laboratorio.

		CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES																																			
ETAPAS	ACTIVIDADES	ENERO				FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO				JULIO				AGOSTO				SETIEMBRE			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
PRIMERA ETAPA	Recolección de las muestras de los efluentes de las curtiembres																																				
	Determinación de los parámetros fisicoquímicos de las muestras																																				
	Evaluación del estado de los efluentes según los LMP																																				
SEGUNDA ETAPA	Aislamiento de aislados bacterianos resistentes al cromo de los efluentes																																				
	Ensayos de tolerancia al cromo de los aislados bacterianos																																				
	Caracterización bioquímica y molecular de <i>P. putida</i> cromo resistente																																				
TERCERA ETAPA	Diseño y construcción del sistema de biorremediación a escala de laboratorio																																				
	Operación del sistema de biorremediación																																				
	Análisis fisicoquímico de las aguas tratadas con el sistema de biorremediación																																				

## 9. Recursos disponibles y presupuesto

En este ítem se permite analizar los recursos disponibles y determinar de una manera muy aproximada el capital necesario para llevar a cabo tanto la obtención del inóculo de un aislado de *P. putida* cromo resistente como la implementación de un sistema de biorremediación en base al uso de un biorreactor del tipo Air lift a escala de laboratorio

### 9.1 Recursos disponibles

**Tabla 99.**

*Personal disponible para la ejecución del proyecto*

PERSONAL	EQUIPOS	CANTIDAD
<b>Laboratorio de Microbiología y Química ambiental de la Universidad Privada del Norte</b>	Técnicos de laboratorios	2
	Asesor con experiencia en Microbiología	1
	Asesor con experiencia en construcción de biorreactores	1
	Personal de Limpieza	2

**Tabla 20.**

*Locales disponibles para la ejecución del proyecto*

LOCAL	EQUIPOS	CANTIDAD
<b>Laboratorio de Microbiología de la Universidad Privada del Norte</b>	Autoclave	1
	Balanza Analítica	1
	Microscopio óptico	1
	Horno de esterilización	1
	Espectrofotómetro	1
<b>Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Privada del Norte</b>	Medidor de pH	1
	Agitador Magnético	1
	Mufla	1

## 9.2 Recursos no disponibles

### 9.2.1 Costos directos

Teniendo en cuenta que ciertos equipos ya se encuentran en las instalaciones del laboratorio, sólo se realizó una estimación de costos de las piezas e instrumentación del biorreactor. Para la estimación de los costos, se han empleado cotizaciones consultadas en catálogos y proveedores. En la tabla 14 se muestran los precios en soles tomando en cuenta el actual valor del dólar.

**Tabla 21.**

*Costos de los equipos para la construcción del sistema de biorremediación a escala de laboratorio*

<b>EQUIPOS</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>COSTO UNITARIO</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Equipo para biorreactor</b>	1	S/.1800	S/.1800
<b>Rotámetro</b>	1	S/.1000	S/.1000
<b>Sensor de Temperatura</b>	1	S/.2000	S/.2000
<b>Sensor de pH</b>	2	S/.600	S/.1200
<b>Mangueras</b>	2	S/.400	S/.150
<b>Sensor nivel de espuma</b>	1	S/.2 000	S/.2 000
<b>bridas</b>	1	S/. 52	S/. 260
<b>Soporte</b>	3	S/. 1 500	S/. 1500
<b>Filtros</b>	1	S/. 120	S/. 240
<b>Compresora de aire</b>	1	S/. 5 000	S/. 5 000
<b>TOTAL</b>			<b>S/. 15150</b>

**Fuente:** basada en información proporcionada por mercado libre

### 9.2.2 Costos indirectos

Entre las materias primas, se consideran los compuestos químicos que son necesarios para la preparación del caldo para el biorreactor. Para esto se realizó un análisis de costos para los compuestos correspondientes al medio de preparación, lo cual se resumen en la tabla.

**Tabla 22.**

*Costos de los insumos para la preparación del medio y caldo de cultivo*

INSUMOS	UNIDADES	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	TOTAL
Agar	g	250 g	S/.350	S/.350
$C_6H_{12}O_6$	g	250 g	S/.250	S/.250
$(NH_4)_2SO_4$	g	250 g	S/.120	S/.120
$Na_2HPO_4$	g	250 g	S/. 170	S/. 170
$K_2HPO_4$	g	250 g	S/.260	S/.260
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	g	100 g	S/.120	S/.120
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	g	100g	S/.340	S/.340
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	g	100 g	S/.130	S/.130
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	g	100 g	S/.240	S/.240
<b>TOTAL</b>				<b>S/.1980</b>

**Fuente:** basada en información proporcionada por sigma Aldrich

Además de las materias primas que van directamente dentro del producto, también se deben tener en cuenta otros materiales, como los de protección personal, y de desinfección, aunque la producción no está bajo riesgo biológico, es necesario usar material de protección para proteger y evitar cualquier posible contaminación cruzada del producto. La información de los conceptos de materia de uso personal se describe en la tabla 17.

**Tabla 103.**

*Costos de los utensilios de uso personal*

<b>UTENSILIO</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>COSTO UNITARIO</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Tapabocas desechables</b>	2 cajas	S/.70	S/.140
<b>Guantes de Nitrilo (pares)</b>	3 cajas	S/.60	S/.180
<b>Cofias</b>	1 caja	S/.70	S/.70
<b>Batas</b>	3 unidades	S/. 90	S/.270
<b>Etanol al 70%</b>	20 unidades	S/.50	S/.1000
<b>Hipoclorito de sodio</b>	10 unidades	S/.20	S/.200
<b>TOTAL</b>			<b>S/. 1860</b>

**Fuente:** basada en información proporcionada por Merck y Casa Medik

**Tabla 24.**
*Costos de los servicios involucrados para el sistema de biorremediación*

SERVICIOS	ENTIDAD RESPONSABLE	COSTO UNITARIO	TOTAL
<b>Caracterización molecular de <i>P. putida</i></b>	Laboratorio de Biología Molecular - UNAM	S/. 10, 000.00	S/. 10, 000.00
<b>Caracterización físicoquímica de aguas residuales de las Curtiembres</b>	Laboratorio Regional del Agua - Cajamarca	S/. 3, 000.00	S/. 6, 000.00
	Laboratorio de Servicios a la Comunidad e Investigación - UNT	S/. 4, 000.00	S/. 8, 000.00
<b>Transporte y viajes</b>	--	--	S/. 2, 000.00
<b>Impresión y escaneo</b>	..	..	S/. 500.00
<b>TOTAL</b>			<b>S/. 26500.00</b>

**Fuente:** basada en información proporcionada por Universidades

## 10. Resultados esperados

- Disminuir significativamente los niveles de cromo hexavalente al menos en un 50% en las aguas residuales provenientes de las Curtiembres del distrito El Porvenir, La Libertad.
- Evaluar el comportamiento hidrodinámico y la transferencia de masa de oxígeno durante el funcionamiento del biorreactor Air-lift para la determinación de sus eficiencia y limitaciones.
- Culminar el diseño del biorreactor Air lift a escala de laboratorio para la construcción de biorreactor de mayor alcance como a escala de banco, semiindustrial o industrial.
- Establecer y detallar un presupuesto inicial económicamente aceptable para la construcción posterior de un biorreactor air-lift de mayor alcance.
- Concluir que la propuesta del diseño de un biorreactor air lift para el tratamiento del cromo hexavalente de las aguas residuales de las curtiembres sea viable, y así los propietarios de las curtiembres lo puedan reconocer como una buena alternativa para dar un manejo adecuado a sus residuos.

### ANEXO 3

#### FORMATO DE VALORACIÓN DE EXPERTOS

1. Título de la propuesta:				
2. Nombres y apellidos del estudiante o estudiantes:				
3. Nombres y apellidos del evaluador: Especialidad:				
4. Sede:	5. Carrera:	6. Facultad:		
7. Resumen ejecutivo de la investigación				
8. Criterios a valorar de la propuesta				
CRITERIOS	INDICADORES	CUMPLIMIENTO		OBSERVACIONES
		si	no	
	Tareas			
Alcance	Plazos			
	costos			
Planificación	Calendario (diagrama de Gantt)			

Presupuesto	Costos directos			
	Costos indirectos			
EVALUACIÓN: resultados, comentarios, recomendaciones, etc. (párrafo máximo de 200 palabras)				

\_\_\_\_\_  
Firma y Sello del evaluador.

## ANEXO 4

### INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

# ENTREVISTA

Fecha de entrevista:  Hora:  Duración:

Lugar de la entrevista:

Nombre y apellidos del entrevistador:

Nivel de estudios del entrevistador:

Dirección domiciliaria:

Teléfono:

Celular:

Correo electrónico:

## 1. DATOS GENERALES DE LA EMPRESA

Nombre de la Empresa:  RUC:

Dirección:

Teléfono:

Correo electrónico:

Estado actual de la empresa:

Actividades principales:

## 2. DATOS PERSONALES DEL ENTREVISTADO

Nombres y apellidos completos:

Sexo:  Edad:

Cargo Laboral:

Teléfono:

Celular:

Correo electrónico:

## 3. GENERALIDADES DE LA EMPRESA

3.1 ¿Cuánto tiempo viene trabajando la empresa? Especifique.

3.2 Aproximadamente, ¿Cuánto es la ganancia anual neta de la empresa? Especifique.

3.3 ¿Cómo es la calidad del sistema eléctrico en la empresa? Especifique.

3.4 ¿Cómo es la calidad del sistema de agua en la empresa? Especifique.

3.5 ¿Cómo es la calidad del sistema de iluminación de la empresa? Especifique.

3.6 ¿Qué cantidad de agua residual se utiliza o llega al drenaje diariamente? Especifique.

3.7 ¿Tiene relaciones sociales con las curtiembres aledañas? Especifique.

3.8 ¿Realizan reuniones con las curtiembres aledañas? Especifique.

#### 4. INFORMACIÓN SOBRE TRATAMIENTOS EN AGUAS RESIDUALES

4.1. La empresa, ¿tienen conocimiento o alguna información sobre las normas ambientales que rige el país? Especifique.

4.2 En la empresa, ¿realizan algún tratamiento a las aguas residuales antes de llegar al drenaje? Especifique.

4.3 ¿Qué tratamientos químicos realizan a las aguas residuales antes de llegar al drenaje? Especifique.

4.4 ¿Tienen conocimientos o alguna información sobre tratamientos biológicos empleando bacterias? Especifique.

4.5 En la empresa ¿Se cuenta con un espacio mínimo de aproximadamente 10 m<sup>2</sup> para la instalación de un biorreactor? Especifique.

4.6 La empresa ¿estaría de acuerdo con la implementación de algún sistema de tratamiento para las aguas residuales? Especifique.

**Fuente:** Elaboración Propia.

## ANEXO 5

### ETIQUETA PARA TOMA DE MUESTRAS DE AGUA RESIDUAL (12 cm x 8.5 cm)

<b>Nombre de la PTAR:</b>	
<b>Denominación del punto de Monitoreo (afluente o efluente):</b>	
Nº de muestra (orden de toma de muestra)	
Fecha y hora	
Ensayo físico químico	<input type="checkbox"/> DBO <input type="checkbox"/> DQO <input type="checkbox"/> AyG <input type="checkbox"/> SST
Ensayo microbiológico	<input type="checkbox"/> CCT
Otros parámetros	
Otros parámetros	
Preservación	
Operador del muestreo	

Nota: Los laboratorios acreditados ante INDECOPI pueden utilizar su propia etiqueta para de muestras de agua residual

**Fuente:** Protocolo de monitoreo de la calidad de los efluentes. Oficina del Medio Ambiente & Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS)