

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGIA Y MEDIO
AMBIENTE



TESIS

DEGRADACIÓN DEL FENOL EN AGUAS RESIDUALES DE BAÑOS
QUÍMICOS PORTÁTILES DEL SECTOR CONSTRUCCIÓN MEDIANTE

Pseudomonas aeruginosa

PRESENTADA POR:

LUIS ALBERTO SUPO QUISPE

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE

PUNO, PERÚ

2020

DEDICATORIA

A Dios, quien me dio la fortaleza necesaria para salir siempre adelante pese a las dificultades, dándome las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día.

A mis amores Sandra y Stephano Gerard; que fueron mi estímulo para llegar al final, por eso a ustedes les dedico mi esfuerzo.

A mis Padres por su apoyo. Madre, serás siempre mi inspiración, por enseñarme que todo se aprende y que todo esfuerzo es al final recompensado.

AGRADECIMIENTOS

- Doy infinitas gracias a Dios, por el camino recorrido lograr una meta más.
- A la Universidad Nacional del Altiplano y a la Escuela de Postgrado, ofreciéndome más que un recinto de estudios.
- A mis amores Sandra y Stephano Gerard cuyo amor crece cada día, a mis padres y hermana, por el apoyo que me brindaron, por todos estos años que confiaron en mí comprendiendo mis ideales y la lucha por mis sueños que supieron inculcar en mi desde el comienzo de mi vida.
- A la empresa Ecovida Grupo Inmobiliario S.A.C., a su gerente Ing. Carlos Zeballos Madariaga y al personal que labora, por su ayuda y amistad.
- A los miembros del jurado Dr. Luis Vicente Olivera Marocho, Dr. Roger Huanqui Pérez y Dra. Myriam Eugenia Pacheco Tanaka; por sus sabias observaciones e indicaciones, por el apoyo brindado para la ejecución y término de este trabajo de investigación.
- Mi reconocimiento a la Dra. Edith Tello Palma, asesor de tesis, por su acertada conducción del trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Marco teórico	4
1.1.1 Baño químico portátil	4
1.1.2 Principales componentes de las aguas residuales de los baños químicos portátiles	4
1.1.3 Aguas residuales	6
1.1.4 Disposición de aguas residuales	6
1.1.5 Características físicas y químicas de las aguas residuales	6
1.1.6 Fenol	8
1.1.7 Propiedades físicas del fenol	9
1.1.8 Propiedades químicas	9
1.1.9 Toxicidad del fenol	10
1.1.10 Fuentes de generación y eliminación del fenol en aguas residuales	11
1.1.11 Biodegradación del fenol por microorganismos	12
1.1.12 Género <i>Pseudomonas</i>	13
1.1.13 Ecología	15
1.1.14 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.1.15 Características de la <i>Pseudomona aeruginosa</i>	17
1.1.16 Mecanismo de biodegradación del fenol	18
1.1.17 Inmovilización de la <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18

1.1.18	Ventajas de la inmovilización	19
1.1.19	Encapsulamiento de la <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con geles de alginato de calcio	19
1.1.20	Estructura química del alginato de calcio	20
1.1.21	Formación del gel de alginato de calcio	21
1.2	Antecedentes	22
1.2.1	Aislamiento e Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.2.2	Adaptación de microorganismos para la biodegradación de fenol	25
1.2.3	El género <i>Pseudomonas</i> como biodegradadores de fenol	27
1.2.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y su capacidad para biodegradar fenol	28
1.2.5	Otras bacterias biodegradoras de fenol	30

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1	Identificación del problema	33
2.2	Enunciados del problema	34
2.2.1	Problema general	34
2.2.2	Problemas específicos	34
2.3	Justificación	34
2.4	Objetivos	36
2.4.1	Objetivo general	36
2.4.2	Objetivos específicos	36
2.5	Hipótesis	36
2.5.1	Hipótesis general	36
2.5.2	Hipótesis específicas	36

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Lugar de estudio	37
3.2	Población	38
3.3	Muestra	39
3.4	Método de investigación	39
3.5	Descripción detallada de métodos por objetivos específicos	40

CAPÍTULO IV**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1	Aislamiento de bacterias con capacidad degradativa de fenol	45
4.2	Adaptación de las bacterias a diferentes concentraciones de fenol	49
4.3	Degradación de fenol presente en aguas residuales provenientes de los baños químicos	54
4.4	Modelo estadístico y significancia estadística de los parámetros de estudio	62
4.5	Prueba de hipótesis de diferencia por parejas	64
CONCLUSIONES		66
RECOMENDACIONES		67
BIBLIOGRAFÍA		68
ANEXOS		79

Puno, 14 de Agosto de 2020

ÁREA: Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente**TEMA:** Degradación del fenol**LÍNEA:** Evaluación tecnológica y del medio ambiente

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Parámetros de interés en el agua residual industrial	7
2. Parámetros de conservación del ambiente acuático - categoría 4.	7
3. Propiedades físicas del fenol	9
4. Compuestos fenólicos clasificados por la EPA	11
5. Ventajas del uso de microorganismos en tratamientos biológicos	13
6. Especies de <i>Pseudomonas</i> agrupadas según el grado de identidad de sus ARNr. Los grupos II, III, IV y V, actualmente están ubicados en nuevos géneros de alpha proteobacteria	14
7. Ubicación de zona de estudio y punto de muestreo	37
8. Método de ensayo utilizados por el laboratorio LAS, para el análisis de concentración de fenol	39
9. Crecimiento en medios de cultivo	45
10. Crecimiento bacteriano en un tiempo de 24 a 72 horas	46
11. Pruebas bioquímicas para identificación <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
12. Crecimiento de colonias en agar nutritivo	49
13. Concentración de fenol inicial (llevada al límite)	55
14. Concentración de fenol final (llevada al límite) pasados 120 horas	55
15. Concentración de fenol inicial	56
16. Concentración de fenol final pasados 72 horas	56
17. Degradación del fenol presente en aguas residuales de concentración inicial de 368 mg/L por medio de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inmovilizadas en matrices de geles de alginato de calcio	57
18. Degradación del fenol presente en aguas residuales de concentración inicial de 5 mg/L por medio de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inmovilizadas en matrices de geles de alginato de calcio	57
19. Promedio y desviación estándar de la presencia de fenol antes y después del experimento	62
20. Prueba de hipótesis unilateral de la diferencia pareada antes y después del efecto de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en la capacidad degradativa frente al fenol	63
21. Prueba de hipótesis de diferencia por parejas	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Estructura química del fenol	9
2. Espectro de infrarrojo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
3. Composición monomérica del ácido algínico. M: β -D- Manurónico, G: α -L-Glucurónico.	20
4. Bloques poliméricos de ácido manurónico (M) y ácido glucurónico (G).	21
5. Estructura conformacional: Diagrama representativo de la interacción del ion calcio con los segmentos poliglucurónicos para la formación del gel alginato de calcio.	21
6. Estructura del alginato de calcio.	22
7. Mapa de la ciudad de Caracoto con indicación de la zona de muestreo	38
8. Baño químico portátil	38
9. Crecimiento de bacterias en Agar TSA a las 72 horas a 37 ⁰ C	46
10. Crecimiento de bacterias en Agar MacConkey a las 48 horas a 37 ⁰ C	47
11. Crecimiento de bacterias en Agar Cetrimide a las 72 horas a 37 ⁰ C	47
12. Tinción de Gram: bacilos gramnegativos	48
13. Resultado de las pruebas bioquímicas (Citrato, LIA, TSI y UREA).	48
14. Crecimiento de colonias en concentración de 7mg/L.	50
15. Crecimiento de colonias en concentración de 35mg/L.	50
16. Crecimiento de colonias en concentración de 70 mg/L.	51
17. Crecimiento de colonias en concentración de 350 mg/L.	51
18. Crecimiento de colonias en concentración de 700 mg/L.	52
19. Crecimiento de colonias en concentración de 1050 mg/L.	52
20. Crecimiento de colonias en concentración de 1400 mg/L.	53
21. Crecimiento de colonias de bacterias en función de la concentración de fenol.	53
22. Crecimiento de colonias de bacterias en función del tiempo.	54
23. Porcentaje de remoción del fenol para una concentración de 368 mg/L (llevada al límite).	58
24. Comportamiento del pH antes y después de la degradación para una concentración de 368 mg/L (llevada al límite).	58
25. Comportamiento de la temperatura antes y después de la degradación para una concentración de 368 mg/L (llevada al límite).	59

26. Porcentajes de remoción del fenol con el tiempo para una concentración de 5 mg/L.	59
27. Comportamiento del pH antes y después de la degradación para una concentración de 5 mg/L.	60
28. Comportamiento de la temperatura antes y después de la degradación para una concentración de 5 mg/L.	60
29. Promedio y desviación estándar de la presencia de fenol antes y después del experimento.	62
30. Prueba de hipótesis unilateral de la diferencia pareada antes y después del efecto de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en la capacidad degradativa frente al fenol.	63
31. Pesado de agares para aislamiento y acondicionamiento de bacterias.	85
32. Preparación de medios de cultivo.	86
33. Aislamiento de bacterias.	86
34. Preparación de medios de cultivo	87
35. Repique de bacterias	87
36. Siembra de bacterias	88
37. Baño químico portátil	88
38. Adaptación de baterías a altas concentraciones	89
39. Preparación de medios para encapsulamiento	89
40. Cabina de flujo de laminar para encapsulamiento	90
41. Coloración Gram	90
42. Coloración Gram	91
43. Bacterias coloreadas con tinción Gram	91
44. Bacterias coloreadas con tinción Gram	92
45. Aislamiento de bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	92
46. Fenol químicamente puro	93
47. Caldo nutritivo	93
48. Perlas de alginato de calcio	94
49. Encapsulamiento en perlas de alginato de calcio	94
50. Fenol a alta concentración	95
51. Degradación de fenol con perlas de alginato de calcio	95
52. Aireación constante	96
53. Muestras de aguas residuales	96
54. Muestras con acción de perlas de alginato de calcio	97

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Certificación análisis de laboratorio	80
2. Cadena de custodia – Laboratorios Analíticos del Sur	83
3. Normatividad nacional	84
4. Panel fotográfico	85

ACRÓNIMOS

Sigla	Denominación
ANA	Autoridad Nacional del Agua.
DIREPRO	Dirección Regional de la Producción.
ECA	Estándares de Calidad Ambiental
EPA	Environment Protection Agency
IMARPE	Instituto del Mar del Perú.
ISQG	Interim Sediment Quality Guideline - Guía de calidad de sedimentos interinos
LMP	Límites Máximos Permisibles.
MINAGRI	Ministerio de Agricultura y Riego.
MINEM	Ministerio de Energía y Minas.
PRODUCE	Ministerio de la Producción
MINAM	Ministerio del Ambiente.
OEFA	Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental.
PELT	Proyecto Especial Binacional lago Titicaca.
pH	Potencial de hidrogeniones
SENAMHI	Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología.
T°	Temperatura
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacetico

RESUMEN

Las aguas residuales de baños portátiles son consideradas aguas residuales industriales debido a la alta carga contaminante, entre los principales y más tóxicos se encuentran los compuestos fenólicos que hacen que sea necesario y obligatorio el tratamiento adecuado antes de verterlo en los sistemas de alcantarillado. La investigación fue realizada en la empresa Concretos Supermix S.A. Tuvo como objetivo, evaluar la degradación del fenol de aguas residuales de baños químicos portátiles mediante *Pseudomonas aeruginosa*. Se obtuvieron las cepas microbianas a partir de muestras de aguas residuales provenientes de baños químicos portátiles, el crecimiento de bacterias se realizó en medios de cultivos generales y selectivos. La inmovilización se realizó por atrapamiento de bacterias, en una matriz de alginato de calcio. La adaptación fue de forma gradual con incrementos de dosificación de fenol en concentraciones de 7 a 1400 mg/L, en medio mineral (20%) con 10% de cultivo de cepas, en un periodo de 72 a 168 h, se emplearon 310 perlas de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas, con tiempos de contacto de 168 h para concentraciones iniciales de 368 mg/L de fenol, obteniendo como concentración final de 91.4 mg/L (porcentaje de remoción de 75.2%) y para las 3 muestras de 5 mg/L de fenol, se emplearon 125 perlas, con tiempos de contacto de 96 h, obteniendo como concentración final 0.34; 0.18 y 0.21 mg/L (porcentaje de remoción de 93.2; 96.4; 95.8%). Se concluye que *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada tiene capacidad para degradar fenol.

Palabras clave: Agua residual, baño químico, biodegradación, fenol, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Wastewater from portable toilets is considered industrial waste water due to the high pollutant load, among the main and most toxic are the phenolic compounds that make proper treatment necessary and mandatory before discharge into sewage systems. The research was carried out in Concretos Supermix S.A company. Its objective was to evaluate the degradation of phenol from portable chemical toilet wastewater by *Pseudomonas aeruginosa*. The microbial strains were obtained beginning with wastewater samples from portable chemical toilets, the bacteria growth was carried out in general and selective culture media. Immobilization was carried out by trapping bacteria, in a calcium alginate matrix. The adaptation was gradual with increases in phenol dosage in concentrations from 7 to 1400 mg/L, in mineral medium (20%) with 10% of strain culture, in a period of 72 to 168 h, 310 immobilized *Pseudomonas aeruginosa* beads were used, with contact times of 168 h for initial concentrations of 368 mg/L of phenol, obtaining a final concentration of 91.4 mg/L (removal percentage of 75.2%) and for the 3 samples of 5 mg/L of phenol, 125 beads were used, with contact times of 96 h, obtaining a final concentration of 0.34; 0.18 and 0.21 mg/L (removal percentage of 93.2; 96.4; 95.8%). It is concluded that immobilized *Pseudomonas aeruginosa* has the ability to degrade phenol.

Key words: Waste water, chemical bath, biodegradation, phenol, *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

El fenol y sus derivados son la unidad estructural básica en una amplia variedad de compuestos orgánicos sintéticos (Annadurai *et al.*, 2002). Es un compuesto aromático orgánico que ocurre naturalmente en el medio ambiente (Prpich & Daugulis, 2005), pero también se produce artificialmente a partir de actividades industriales como el procesamiento de petróleo, la fabricación de plásticos, la producción de resina, la producción de pesticidas, la fabricación de acero y la producción de pinturas y barnices (Kumari *et al.*, 2013); (Bandyopadhyay *et al.*, 1998).

Este compuesto aromático es soluble en agua y altamente móvil (Collins & Daugulis, 1999) y, como tal, las aguas residuales generadas a partir de estas actividades industriales que contienen altas concentraciones de compuestos fenólicos (Chang *et al.*, 2001) que eventualmente pueden llegar a arroyos, ríos, lagos y tierra, lo que representa un grave problema ecológico debido a su uso generalizado y su presencia en todo el medio ambiente (Zilli *et al.*, 2007). El fenol es un contaminante prioritario de la lista de la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA, 2014) y la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades, lo considera un compuesto tóxico (ATSDR, 2018). Los efectos adversos del fenol en la salud están bien documentados (Calabrese & Kenyon, 2018) y se ha informado de la muerte entre adultos con la ingestión de fenol en un rango de 1 a 32 g (Prpich & Daugulis, 2005).

La baja volatilidad del fenol y su afinidad por el agua hacen que el consumo oral de agua contaminada sea el mayor riesgo para humanos (Prpich & Daugulis, 2005). Se ha utilizado una variedad de técnicas para la eliminación de fenol de efluentes industriales y aguas contaminadas, y la bioremediación recibe la mayor atención debido a su capacidad para el medio ambiente, su capacidad para mineralizar completamente compuestos orgánicos tóxicos y de bajo costo (Odokuma & Okpokwasili, 1993).

La degradación microbiana del fenol se ha estudiado activamente y estos estudios han demostrado que el fenol puede ser degradado aeróbicamente por una amplia variedad de cultivos de hongos y bacterias como *Candida tropicalis* (Ruiz-Ordaz *et al.*, 2001), *Acinetobacter calcoaceticus* (Oboirien *et al.*, 2017), *Alcaligenes eutrophus* , *Pseudomonas putida* y *Burkholderia cepacia* G4 (Hill & Robinson, 1975).

Se ha demostrado que el tratamiento de pequeños volúmenes de compuestos tóxicos en el punto de emisión utilizando cepas microbianas específicas y mejores biorreactores permite un mayor control sobre el proceso y mayores eficiencias de eliminación (Kotturi *et al.*, 1991). Por lo tanto, se reconoce que la optimización de las variables del proceso es un aspecto esencial de la fermentación exitosa (Ruiz-Ordaz *et al.*, 2001). La alta dependencia de la actividad enzimática y los requisitos de mantenimiento celular de la temperatura hacen que sea una cantidad importante.

La temperatura ejerce una importante influencia reguladora sobre la tasa de metabolismo (Ghosh & Swaminathan, 2003). Los efectos del suministro de oxígeno varían de una especie a otra (Xu *et al.*, 2016). Además, la transferencia de masa de oxígeno se ve favorecida por las tasas de agitación que crean las turbulencias y las fuerzas de corte en el sistema de cultivo causan influencias significativas en la tasa de crecimiento y la formación del producto (Hoq & Deckwer, 1995). Este trabajo examina el efecto de la temperatura, la aireación y la agitación en la degradación del fenol por las cepas locales de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando tanto el método clásico de optimización que implica variar el nivel de un parámetro a la vez en un cierto rango mientras se mantiene el resto de las variables constante y técnica de optimización estadística para efecto multivariable.

Por lo citado anteriormente, el presente trabajo de investigación tiene como objetivos: Evaluar la degradación del fenol de aguas residuales de baños químicos portátiles mediante *Pseudomonas aeruginosa*, aislar bacterias con capacidad degradativa de fenol, adaptar la bacteria aislada a diferentes concentraciones crecientes de fenol y evaluar la capacidad de biodegradación de la bacteria inmovilizada en una matriz de alginato de calcio.

El trabajo de investigación se encuentra dividido en los siguientes capítulos: Capítulo I. Fundamentos teóricos de la investigación, se expone las teorías centrales y referenciales de baños químicos, aguas residuales, fenol, *Pseudomonas aeruginosa*, a ello se acompaña los objetivos de la investigación y las hipótesis, capítulo II. El problema refiere a la contaminación del agua debido a altas concentraciones de fenol que conlleva a la investigación seguida de la justificación, el capítulo III. Describe la metodología de la investigación, el método, diseño tipo y nivel de investigación que le dan orientación al estudio al igual que la cobertura del estudio de la muestra, las técnicas e instrumentos que

han viabilizado para el recojo de la información y finalmente el capítulo IV. Resultados y discusión. Dedicado a los resultados de la investigación con aplicación de instrumentos en los diferentes cuadros estadísticos, contrastación de hipótesis, ecuación de Monod y culmina con las conclusiones, recomendaciones, bibliografía consultada y los anexos referidos.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Marco teórico

1.1.1 Baño químico portátil

Es una cabina personal, el cual contiene un recipiente hermético en la parte inferior del mismo, donde se almacenan los residuos orgánicos sólidos y líquidos generados por las personas que la utilizan. Generalmente viene con un tubo que va desde el recipiente hermético hasta la parte superior exterior de la cabina para ventear los gases que se forman en él. El recipiente hermético, además de agua, contiene elementos químicos en polvo o líquido que secuestran los olores que generan los residuos albergados en él, evitando también que las descargas de los humanos vayan directamente al medio ambiente (Bódalo *et al.*, 2008).

1.1.2 Principales componentes de las aguas residuales de los baños químicos portátiles

Los insumos principales de los baños portátiles son compuestos sólidos en polvo o granulados y vienen en presentaciones en bolsas de concentrado de 20 a 30 gramos y son diluidos en un volumen determinado de agua para luego ser acondicionados en un receptáculo interior del baño portátil ubicado cerca o encima al inodoro, desde donde son vertidos con cada descarga que se efectúe. La presentación en estado líquido viene en galones semiconcentrados y se mezclan con agua y se depositan en el receptáculo interior del baño portátil ubicado cerca o encima del inodoro, desde donde son vertidos con cada descarga que se efectúe. Existen otras presentaciones en pastillas sólidas, tipo pato tanque, donde estas son introducidas en el fondo del receptáculo del baño portátil y con el tiempo de

residencia empiezan a colorar y mezclarse con el agua contenida en este sector, para luego ser vertidas en cada descarga que se efectúe. Para el mantenimiento y evacuación de las aguas residuales de los baños portátiles debe ser manejada por personal instruido y con el uso de sus equipos de protección personal (Forero *et al.*, 2006).

Los componentes principales, que contienen estas aguas residuales son: Fenol, dodecil benceno sulfonato de sodio, cloruro de benzalconio (n-alkil bencil cloruro de amonio), ácido dodecil bencen sulfónico, alquil bencen sulfonato de sodio, dicloroisocianurato de sodio (tricloseno sódico), hidroxietil celulosa, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), cuaternario de amonio, Sulfato de sodio, Cloruro de didecil dimetil amonio, Cloruro de dioctilo dimetil amonio, Formaldehído, Glutaraldehido, Óxido de etileno etoxilado, azul de metileno, Nonil fenol, Alcohol etílico, urea, colorantes y perfumes. Algunos de los componentes químicos mencionados, en combinaciones, son agregados al recipiente hermético del baño portátil en forma de polvo o líquido, que al mezclarse con agua y con los residuos generados por el hombre, forman las aguas residuales de los baños portátiles. La mayoría de los componentes químicos usados en los baños portátiles para retener los olores, son considerados tóxicos para cualquier ecosistema, principalmente por no ser biodegradables, ya que contienen enlaces dobles, cadenas cíclicas (bencénicas y fenólicas) que son difíciles de romper. Son estos compuestos lo que dan características a las aguas residuales de los baños portátiles y por lo tanto denominarlos aguas residuales industriales. Los compuestos fenólicos son los principales integrantes de las aguas residuales de los baños portátiles, y es por tanto el elemento a remover o a reducir en el tratamiento propuesto en esta investigación (Quicaño, 2014).

En el Perú, debido a la falta de leyes que limiten el uso indiscriminado de compuestos elevadamente tóxicos para el medio ambiente, así como el acceso sin restricciones y el bajo costo en el mercado, el uso de estos componentes químicos tóxicos se hace masivo. En la actualidad las empresas que usan y alquilan estos baños portátiles se han incrementado enormemente (Guevara, 2010).

1.1.3 Aguas residuales

Son aquellas aguas cuyas características originales han sido modificadas por actividades humanas y que por su calidad requieren un tratamiento previo, antes de ser reusadas, vertidas a un cuerpo natural de agua o descargadas al sistema de alcantarillado, siendo su clasificación:

- a. Aguas residuales industriales: Son aquellas que resultan del desarrollo de un proceso productivo, incluyéndose a las provenientes de la actividad minera, agrícola, energética, agroindustrial, entre otras.
- b. Aguas residuales domesticas: Son aquellas de origen residencial y comercial que contienen desechos fisiológicos, entre otros, provenientes de la actividad humana, y deben ser dispuestas adecuadamente.
- c. Aguas residuales municipales: Son aquellas aguas residuales domésticas que pueden estar mezcladas con aguas de drenaje pluvial o con aguas residuales de origen industrial previamente tratadas, para ser admitidas en los sistemas de alcantarillado de tipo combinado (OEFA, 2019).

1.1.4 Disposición de aguas residuales

La disposición de aguas residuales sin tratamiento alguno y las aguas residuales tratadas inadecuadamente contaminan los cuerpos de agua natural. A su vez, por infiltración en el subsuelo contaminan las aguas subterráneas, por lo que se convierten en focos infecciosos para la salud de las poblaciones, así como para la flora y fauna del lugar. Hay sobrecarga de aguas residuales en las plantas de tratamiento cuya infraestructura es insuficiente, lo cual origina que los efluentes tratados excedan los límites máximos permisibles (LMP), y no se cumplan con los estándares de calidad ambiental (ECA). Esto genera problemas ambientales como la contaminación de los cuerpos de agua y la generación de malos olores que causan conflictos con la población (OEFA, 2019).

1.1.5 Características físicas y químicas de las aguas residuales

La composición del agua residual se refiere a las propiedades físicas y a los componentes químicos, biológicos y microorganismos patógenos de origen fecal del agua residual; parámetros importantes para el proyecto y explotación de las instalaciones de recogida, tratamiento y vertido, así como para la gestión técnica

de la calidad ambiental, según (Mujeriego, 2015). En el agua residual los parámetros de interés que se observan son los presentados en la Tabla 1.

Tabla 1

Parámetros de interés en el agua residual industrial

Componente	Parámetro de calidad	Descripción
Sustancias orgánicas estables o refractarias al proceso de tratamiento.	Compuestos específicos, como fenoles, pesticidas e hidrocarburos clorados.	Estas sustancias orgánicas ofrecen gran resistencia a los métodos convencionales de tratamiento de agua residual. Algunas son tóxicas en el medio ambiente y su presencia puede limitar la idoneidad de las aguas residuales para riego

Fuente: Mujeriego (2015).

La composición del agua residual viene definida por las cantidades reales de los componentes físicos, químicos y biológicos presentes en ella y puede variar según la composición del agua de cada población. Los valores típicos que estos parámetros toman en el agua residual industrial bruta (sin tratar) son los presentados en la Tabla 2.

Tabla 2

Parámetros de conservación del ambiente acuático - categoría 4.

Parámetro	Unidad de medida	E1:	E2: Ríos		E3: Ecosistemas costeros y marinos	
		Lagunas y lagos	Costa y sierra	Selva	Estuarios	Marinos
Fenoles	mg/L	2.56	2.56	2.56	5.8	5.8

Fuente: MINAM (2019).

Esta tabla presenta los parámetros de los constituyentes de conservación del ambiente acuático. Según las concentraciones de estos constituyentes, el agua residual se clasifica en lagunas y lagos; costa y sierra; selva; estuarios y marinos (MINAM, 2019).

1.1.6 Fenol

El fenol es un compuesto orgánico tóxico, que se caracteriza por la presencia de un grupo hidroxilo (OH) en su anillo bencénico esta estructura básica forma una variedad de compuestos orgánicos sintéticos (Annadurai *et al.*, 2008).

Los fenoles son compuestos orgánicos de fórmula general ArOH, donde Ar corresponde a un compuesto aromático que puede tener sustituyentes. Los fenoles difieren de los alcoholes, porque tienen el grupo –OH directamente unido al anillo aromático. Los fenoles son mucho más ácidos que los alcoholes y la consecuencia práctica de esta acidez es que los fenoles son solubles en hidróxido de sodio acuoso diluido, y son insolubles en disoluciones de carbonato sódico (Agarry *et al.*, 2014). De este modo, con frecuencia es posible separar un componente fenólico de una mezcla de compuestos por medio de una simple extracción con disolvente acuoso básico y posterior reacidificación. En general, los fenoles se nombran como derivados del miembro más sencillo de la familia, el fenol, aunque ocasionalmente se les denomina como hidroxicompuestos (Bushnell & Hass, 2017).

El fenol también es conocido con diferentes nombres, estos son: Ácido carbólico, ácido fénico, ácido fenílico, ácido fenólico, alcohol fenílico, alcohol fenilo, bencenol, benzafenol, fenil hidrato, hidroxibenceno, hidróxido fenilo, izal, monofenol, monohidroxibenceno, oxibenceno, phenol (Inglés), venzénol (Francés), steinkohlenkreosot (Alemán) (Masque, 2016).

1.1.7 Propiedades físicas del fenol

Tabla 3

Propiedades físicas del fenol

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	41
Punto de ebullición (°C)	182
Densidad (g/cm ³)	1.049
Solubilidad 25°C (%)	8.7
Presión de vapor (mm Hg)	0.357 a 20 °C 2.48 a 50 °C 41.3 a 100 °C
Gravedad específica (Agua=1)	1.0545 a 45 °C
Densidad del vapor (Aire=1)	3.24
Solubilidad en agua (g/mL)	0.067 a 16 °C
Límite de inflamabilidad (% vol.)	1.7 – 8.6
Temperatura de auto ignición (°C)	715
pH	4.8 - 6.0 al 5% en agua
Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow	1.46

Fuente: Koneman & Allen (2008).

1.1.8 Propiedades químicas

El fenol posee en su estructura un anillo bencénico y tiene un grupo hidroxilo en lugar de un hidrógeno propio del benceno (C₆H₆). El fenol tiene la siguiente fórmula C₆H₅OH (Naresh *et al.*, 2012).

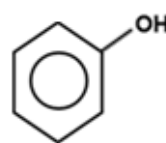


Figura 1. Estructura química del fenol

Fuente: Tyman (2017).

Gracias a la presencia del anillo bencénico dentro de su estructura, el fenol posee la capacidad de estabilizarse. Esta posibilidad de estabilización del fenol hace que pueda perder con relativa facilidad el hidrógeno de su grupo hidroxilo, haciendo que se comporte como un ácido débil. En presencia de grupos electrofílicos (orientadores–meta) se enfatizan las propiedades ácidas del fenol. El fenol es sensible a agentes oxidantes. La escisión del átomo de hidrógeno perteneciente al

grupo hidroxilo del fenol, es sucedida por la estabilización por resonancia del radical fenoxilo resultante. El radical así formado puede continuar oxidándose con facilidad; el manejo de las condiciones de oxidación y del tipo de agente oxidante empleado, puede conllevar a la formación de productos tales como dihidroxibenceno, trioxibenceno y/o quinonas. Las propiedades químicas mencionadas, hacen del fenol un buen antioxidante, que actúa como un agente de captura de radicales. El fenol es un material combustible en sí mismo, que se quema en presencia de oxígeno, y puede producir monóxido de carbono (CO) como producto de combustión incompleta, el cual es un gas tóxico (Pixton & Paul, 2016).

1.1.9 Toxicidad del fenol

El fenol es un compuesto tóxico que tiene impactos negativos en la flora y fauna. Además, el fenol es un compuesto tóxico para el ser humano ya que estas afectan las funciones vitales. También es la causa de problemas de sabor y olor en agua potable en concentraciones bajas. En aguas muy contaminadas el fenol puede encontrarse desde concentraciones de 1.5 mg/L a 4.5 mg/L. El fenol es muy tóxico para peces y letal a concentraciones de 5 a 20 mg/L, sin embargo, a concentraciones bajas de 0.1 mg/L el agua que rodea afecta el sabor del pescado. Por otro lado, la Agencia de Protección Medio Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) considera a nueve los fenoles contaminantes prioritarios y los califica como químicos persistentes y bioacumulativos como se ve en la tabla 4 (Quan *et al.*, 2014).

Tabla 4

Compuestos fenólicos clasificados por la EPA

Puesto	Nombre del compuesto	Puntaje total
31	Pentaclorofenol	1028
85	Fenol	804
94	2,4,6-triclorofenol	780
115	2,4,5-triclorofenol	754
121	2,4-dinitrofenol	735
130	2,4-dimetilfenol	708
143	Tetraclorofenol	662
243	2,4-diclorofenol	507
245	2-clorofenol	493

Fuente: EPA (2014).

1.1.10 Fuentes de generación y eliminación del fenol en aguas residuales

El fenol y derivados están presentes en los efluentes de numerosas industrias, entre las que destacan las siguientes: química (detergentes, colorantes, pesticidas, explosivos, producción de resinas, nylon, plastificantes, desinfectantes, biocidas, drogas, aditivos para aceites), petroquímica (refinado del petróleo), farmacéutica, galvánica, textil, agroalimentaria (vinícola, oleica), forestal (papel, pulpa), siderúrgica y fotográfica (reveladores), entre otras. El tratamiento de efluentes para la eliminación del fenol y derivados, son mediante procesos químicos, físicos y biológicos.

Procesos químicos.

- Oxidación húmeda.
- Oxidación electroquímica.
- Degradación sonoquímica.

Procesos físicos

- Adsorción: Adsorción sobre carbón activo, adsorción sobre resinas por intercambio iónico.
- Extracción.
- Tecnología de membranas.

Tratamientos biológicos

- Degradación por enzimas.
- Degradación por cultivo de algas.
- Degradación por plantas.
- Degradación por microorganismos (Ren *et al.*, 2008).

1.1.11 Biodegradación del fenol por microorganismos

La degradación del fenol ocurre como resultado del aislamiento, adaptación y enriquecimiento de un gran número de microorganismos que son capaces de crecer a expensas de este compuesto aromático como fuente de carbono y energía, en el que se encuentran bacterias aerobias y anaerobias facultativas aisladas del suelo, como algunas levaduras y ciertos hongos. A continuación se tienen algunas especies bacterianas que han sido utilizadas en la degradación del fenol, como: *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp*, *Achromobacter sp*, *Fusarium sp*, *Phanerocheate chrysosporium*, *Corious versicolor*, *Ralstonia sp*, *Streptomyces sp*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas cepacia G4* también conocido como *Burkholderia cepacia G4*, *Pseudomonas picketti*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas pictorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter sp*, *Ralstonia eutropha*, *Nocardioideess*, *Arthrobacter* como *Desulfobacterium phenolicum sp*. Así mismo, también se han utilizado las siguientes levaduras en la degradación del fenol como la *Candida tropicalis*, *Fusarium flocciferium* y *Trichosporon cutaneum* (Resnik *et al.*, 2016).

Entre todos los microorganismos enumerados, como buenos degradadores de fenol, destacan el género *Pseudomonas* por su capacidad degradativa de compuestos aromáticos, por lo que estas bacterias tienen una aplicación ambiental en la biorremediación y control biológico, donde el proceso de biodegradación del fenol ocurre por mecanismos enzimáticos. Así pues, se obtienen mayor eficiencia de degradación cuando los microorganismos son inmovilizados. A continuación se tienen algunas ventajas del uso de los microorganismos en la biodegradación del fenol (Bódalo *et al.*, 2008).

Tabla 5

*Ventajas del uso de microorganismos en tratamientos biológicos***Ventajas del empleo de microorganismos en procesos de biodegradación**

Altos rendimientos para pequeñas concentraciones de contaminantes.

Permite la completa mineralización.

No son perjudiciales para el medio ambiente.

No presentan costos elevados.

Fuente: Bódalo *et al.* (2008).

1.1.12 Género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* esta constituido por bacilos Gram negativos, móviles por flagelación polar; se encuentran normalmente en el suelo y son patógenos oportunistas en animales, plantas y humanos. Entre los microorganismos del género *Pseudomonas* degradadoras de hidrocarburos y que presentan una serie de actividades naturales sobre xenobioticos, se encuentra la especie *P. aeruginosa*, conocida como bacilo pociánico o de pus azul. Esta bacteria causa al hombre distintos problemas, pero también tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en un área ambiental. Actualmente se conoce que es uno de los pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada, produce biosurfactantes, útiles para la limpieza de aguas contaminadas con hidrocarburos y además posee la capacidad de absorber metales pesados (Pb, Cr y Zn). Cuando estas bacterias se adhieren a una superficie, las células se diferencian por formar microcolonias cubiertas por una matriz extracelular que eventualmente llegan a constituir una película. Las bacterias que forman la biopelícula tienen un metabolismo distinto a las células que crecen en medios líquidos, una de las diferencias más aparentes es su disminuida sensibilidad a antibióticos y otros agentes tóxicos (Quintana & Valerio, 2016).

Pseudomonas literalmente significa “falsa unidad”, derivado del griego pseudo = “falso” y monas = “una sola unidad”. El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que se encuentra dentro del orden *Pseudomonadales*. Las *Pseudomonas* son “células en forma de bastón, curvadas o derechas, pero no helicoidales, de 0.5 - 1 μm de diámetro por 1.5 - 5 μm de longitud”. El desarrollo de técnicas como la hibridación ADN/ADN o ARNr/ADN han permitido una clara visión de las especies de *Pseudomonas*. Siguiendo esta última clasificación, Palleroni propuso cinco grupos taxonómicos (ARN-I a ARN-V). Más tarde, la

secuenciación del ARNr 16S reflejó la diversidad de estos grupos, siendo finalmente ARN-I, dentro de la subclase- γ de *Proteobacterias*, el que a día de hoy se reconoce como el que engloba a las verdaderas *Pseudomonas* (Filloux & Ramos, 2014).

Tabla 6

Especies de Pseudomonas agrupadas según el grado de identidad de sus ARNr. Los grupos II, III, IV y V, actualmente están ubicados en nuevos géneros de alpha proteobacteria.

Grupos	Especies Integrantes
I	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. chlororaphis</i> , <i>P. syringae</i> , <i>P. cichorii</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. alcaligenes</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. agarici</i> , <i>P. angulata</i> , <i>P. fragi</i> , <i>P. synxantha</i> , <i>P. taetrolens</i> , <i>P. mucidolens</i> , <i>P. oleovorans</i> , <i>P. resinovorans</i> .
II	<i>P. (Burkholderia) cepacia</i> , <i>P. gladioli</i> , <i>P. caryophylli</i> , <i>P. (Alcaligenes) pseudomallei</i> , <i>P. mallei</i> , <i>P. (Ralstonia) solanacearum</i> , <i>P. (Ralstonia) pickettii</i> , <i>P. pyrrocinia</i> , <i>P. andropogonis</i> .
III	<i>P. (Comamonas) acidovorans</i> , <i>P. (Comamonas) testosteroni</i> , <i>P. saccharophila</i> , <i>P. facilis</i> , <i>P. delafieldii</i> , <i>P. alboprecipitans</i> , <i>P. palleronii</i> .
IV	<i>P. diminuta</i> , <i>P. vesicularis</i>
V	<i>Pseudomonas</i> spp, X. (<i>Xanthomonas</i>) <i>maltophilia</i> , <i>P. geniculata</i> , <i>P. gardneri</i> .

Fuente: Filloux & Ramos (2014).

Las *Pseudomonas* son Gram – negativas, generalmente móviles y presentan uno o varios flagelos polares, aunque también se han descrito flagelos laterales más cortos. Son de metabolismo respiratorio, nunca fermentativo, aunque pueden producir ligeras cantidades de ácido a partir de la glucosa en aerobiosis, utilizan compuestos orgánicos de bajo peso molecular pero no polímeros; algunos son quimiolitótrofos, utilizan H₂ ó CO₂ como único donador de electrones, algunos utilizan nitrato como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia. Todas las *Pseudomonas* tienen un ciclo de los ácidos tricarbónicos funcional y pueden oxidar sustratos completamente a CO₂. Las *Pseudomonas* tienen requerimientos nutritivos muy simples. En el laboratorio se pueden cultivar en medio mínimo con

alguna materia orgánica en solución como fuente de carbono, a pH neutro, temperaturas del intervalo mesófilo (28 - 40°C) y en general, sin añadir factores de crecimiento. La especie *Pseudomonas* tiene un hábitat de crecimiento en un rango de temperatura de 4 – 42 °C, un pH comprendido entre 4-8 (Filloux & Ramos, 2014).

En el grupo ARN-I, se encuentran el sub grupo fluorescente, estas *Pseudomonas* no acumula PHB (poli β – hidroxibutirato) y produce un pigmento pioverdina (verde amarillento), difusivo e hidrosoluble, que da fluorescencia verde azulada bajo luz ultra violeta de longitud de onda larga (254 nm). La producción de pigmentos fluorescentes aumenta sobre todo en los medios con alta concentración de fosfato. A este grupo pertenecen *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, y *P. alcaligenes*. Sólo los tres primeros miembros de este grupo producen pioverdina, aunque sólo la especie de *P. aeruginosa*, produce el pigmento hidrosoluble azul definido piocianina, y los tres restantes no producen pigmentación (la producción de pigmentos puede demostrarse cuando se cultiva en medio de King A; denominado agar P: producción de piocianina y King B; denominado agar F: producción de pioverdina) (Geng *et al.*, 2015).

Otros pigmentos producidos por otras especies del género son la piorubina (*P. aeruginosa*, color rojo similar al óxido), oxiclolorafina (*P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, color naranja), y la clorafina (*P. chlororaphis*, color verde), entre otros. Muchos de estos pigmentos actúan como sideróforos en los sistemas bacterianos de captación de hierro. La producción de pigmentos puede demostrarse cultivando los microorganismos en medio de King B donde no contiene hierro. Las cepas no pigmentadas presentan un color gris pálido. Cuando crecen en agar sangre, normalmente presentan hemólisis (Al-Khalid & El-Naas, 2012).

1.1.13 Ecología

El genoma de cinco especies diferentes de *Pseudomonas* se ha secuenciado recientemente y han revelado que todas ellas comparten un conjunto de 2000 genes de un total de 5000 a 6000 genes presentes en sus correspondientes genomas. Además, se han descrito que alrededor de 60 especies que poseen una extraordinaria versatilidad metabólica, y se caracterizan por su amplia distribución

en el medio ambiente, habiéndose aislado de plantas, suelos limpios y contaminados, de aguas continentales y marinas. La ubicuidad de las bacterias del género *Pseudomonas* y su capacidad para explotar una amplia variedad de nutrientes, refleja un sistema de adaptación al medio ambiente que no se encuentra en otras bacterias. Por ello se considera a las bacterias del género *Pseudomonas*, un paradigma de versatilidad metabólica, como microorganismos clave, en el reciclado de materia orgánica en los compartimientos aerobios de los ecosistemas, jugando un papel esencial en la mejora y el mantenimiento de la calidad medioambiental. Las *Pseudomonas* son capaces de procesar, integrar y reaccionar frente a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente, donde muestran una alta capacidad de reacción a señales físico-químicas y biológicas. Así pues, se han descrito cepas capaces de adquirir resistencia a metales pesados, disolventes orgánicos y detergentes, los cuales les permiten explorar una amplia gama de fuentes de carbono como nutrientes, así como colonizadores cambiantes y nichos que difícilmente son colonizables, donde obtienen una degradación parcial o total de estos contaminantes hasta conseguir su destrucción o conversión en productos menos dañinos. Este procedimiento es conocido como biorremediación. Entre los compuestos orgánicos que son capaces de metabolizar se encuentran hidratos de carbono, hidrocarburos lineales y aromáticos, ácidos alifáticos, aminas, amidas, aminoácidos, compuestos aromáticos (con diferentes grupos funcionales, como: $-\text{OH}$, $-\text{Cl}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NO}_2$ y $-\text{SO}_3$) y alcoholes. La capacidad de utilizar los compuestos aromáticos es particularmente interesante, dadas las distintas rutas por las cuales las *Pseudomonas* son capaces de metabolizar, por lo tanto, estas hacen su posible utilización en los procesos de descontaminación y biocatálisis (Rodríguez *et al.*, 2013).

1.1.14 *Pseudomonas aeruginosa*

En 1872 fue aislada por primera vez por Schroeter, a partir de muestras ambientales. La denominación de *aeruginosa* deriva de la palabra aeruginoso (aeruginous) que significa “el color del cobre oxidado”. Es un aerobio estricto, algunas cepas pueden crecer anaeróbicamente mediante desnitrificación o mediante la fermentación de compuestos como la arginina o el piruvato. Crece con facilidad en los medios de cultivo y produce en ocasiones un olor dulzón a

uvas. Se desarrolla a temperaturas de 10-2 °C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 35-37 °C. Algunas cepas producen hemólisis. Las mismas emiten pigmentos de fenazina en agar nutritivo, después de 24 horas de incubación a 37 °C y posteriormente a temperatura ambiente; los mismos pueden ser azul (piocianina), amarillo verdoso (pioverdina), rojo (piorubina) y negro (piomelanina). Existe aproximadamente, un 10 % de *Pseudomonas aeruginosa* que son apigmentadas (Ren *et al.*, 2008).

Los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* pueden mostrar varios tipos de colonias: lisas, rugosas, mucoides, redondas, alargadas, con pigmento verde metálico y olor dulzón, que presentan características bioquímicas enzimáticas particulares con susceptibilidades antimicrobiana diferentes. Las *Pseudomonas aeruginosa* generan numerosos exoproductos, incluyendo proteasas, hemolisinas, ramnolípidos y derivados de fenazina, factores potencialmente citotóxicos que aumentan su competitividad y supervivencia. Por ejemplo, el metabolito secundario soluble en agua piocianina (1-hidroxi-5-metil-fenazina) ha mostrado actividad antimicrobiana contra una gran variedad de microorganismos. El estrés por nutrientes induce en *Pseudomonas* algunos cambios morfológicos y bioquímicos que, en condiciones limitantes de crecimiento, la bacteria expresa mecanismos de protección, permitiendo a las células sobrevivir a desafíos ambientales (Aguirre, 2015).

1.1.15 Características de la *Pseudomona aeruginosa*

En la figura 2 se observa la intensidad del ancho de los grupos funcionales presentes en *Pseudomonas aeruginosa*, para una banda de absorción de 3550 a 3200 cm^{-1} , se encuentran los grupos funcionales de: $-\text{OH}$, $-\text{NH}$ y $-\text{NH}_3^+$. En la banda de 3150 a 3080 cm^{-1} , se encuentran los grupos funcionales de $-\text{CH}$ y $-\text{OH}$. En los picos altos de 1690 a 1620 cm^{-1} corresponden al grupo $\text{C}=\text{O}$, donde la banda de ensanchamiento terminal corresponde al grupo COO^- y a los diferentes grupos CONH . Los picos correspondientes de 1100 – 1020 cm^{-1} corresponden a enlaces de $\text{C}-\text{O}$ y $-\text{OH}$ de la banda. La *Pseudomonas aeruginosa* contiene a los elementos: 41.6% C, 18.5% S, 8.09% N, 4.72% H y 0.47% P. Además, contiene 14 aminoácidos, que son: histidina, ácido aspártico, alanina, glicina, ácido glutámico, isoleucina, metionina, arginina, licina, fenilalanina, treonina, cistina, serina y valina con 44.39, 31.28, 27.61, 16.66, 12.35, 5.62, 5.02, 4.76, 4.22, 2.2, 1.96, 0.63,

0.43 y 0.024 mg/L respectivamente. La superficie celular de la *Pseudomonas aeruginosa* contiene COOH, NH₂ y PO₄³⁻ (Filloux & Ramos, 2014).

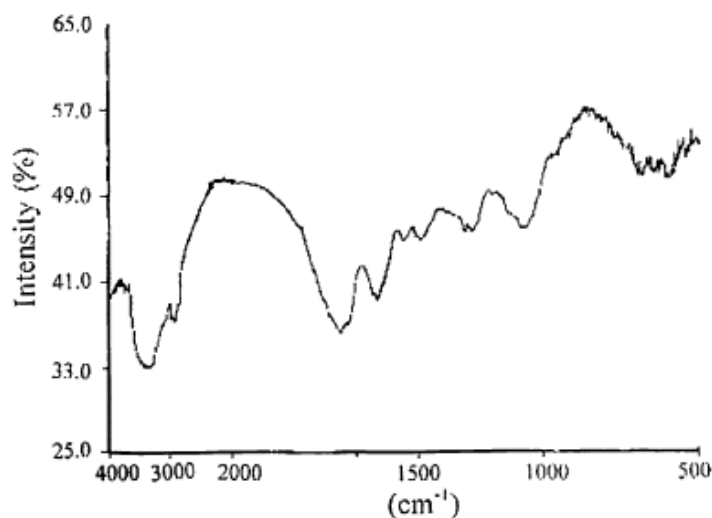


Figura 2. Espectro de infrarrojo de *Pseudomonas aeruginosa*
Fuente: Filloux & Ramos (2014).

1.1.16 Mecanismo de biodegradación del fenol

En el estudio del mecanismo de la biodegradación de compuestos aromáticos por bacterias es necesario conocer los distintos procesos o etapas, mediante los cuales el compuesto se incorpora al metabolismo celular y se transforma en intermediarios de las rutas centrales. Ello implica un conocimiento profundo a) del sistema de transporte a través de la membrana plasmática b) del sistema de hidroxilación y escisión del anillo aromático c) de la ruta seguida en su transformación y su relación con otras rutas metabólicas y d) de los mecanismos de control de los procesos anteriores. La degradación del compuesto aromático puede darse con presencia o ausencia de oxígeno, siendo el catabolismo aerobio el más estudiado (Ren *et al.*, 2008).

1.1.17 Inmovilización de la *Pseudomonas aeruginosa*

La inmovilización celular puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada. Es un evento que se da naturalmente gracias a procesos de adherencia a superficies o a otros microorganismos, debido a estructuras celulares ó a sustancias que estos mismos segregan. De forma artificial o inducida, puede darse por atrapamiento en los

espacios o poros de fibras y geles, entre muchos. El uso de células inmovilizadas permite la operación de biorreactores a velocidades de flujo que son independientes de la velocidad de crecimiento empleadas. La estabilidad catalítica puede ser mayor para células inmovilizadas que para células libres y algunos microorganismos inmovilizados toleran concentraciones más altas de compuestos tóxicos que su contraparte no inmovilizada. La inmovilización permite crear un microclima que aumenta la estabilidad térmica, resistencia a la variación del pH, e influencia de algunos reactivos químicos (Annadurai *et al.*, 2008).

1.1.18 Ventajas de la inmovilización

La inmovilización de diferentes microorganismos en diversos soportes que van desde los biodegradables como residuos orgánicos o agroindustriales, hasta aquellos de difícil o nula degradación como plásticos y fibras de vidrio han permitido el interés y el desarrollo de nuevas tecnologías debido a algunas ventajas que presentan como son:

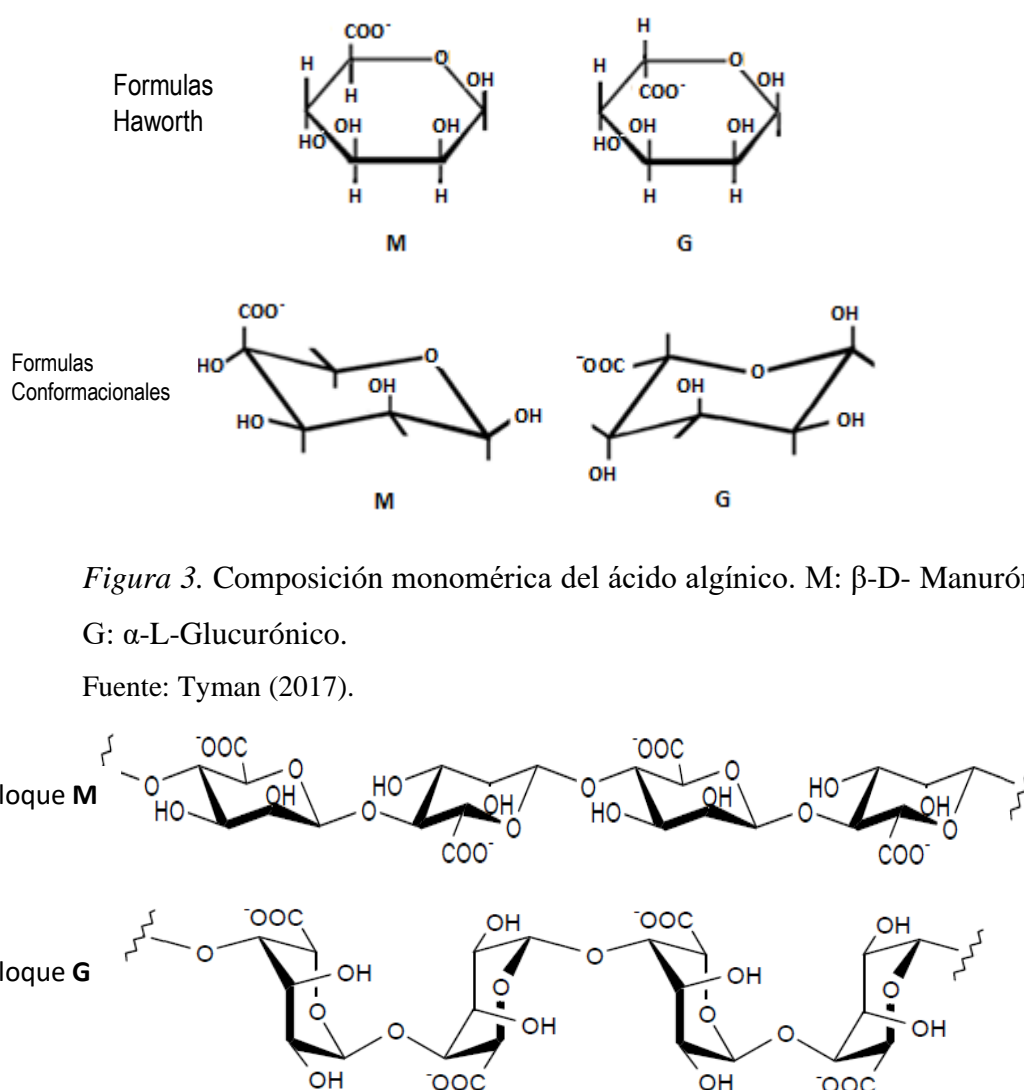
- Concentración de biomasa
- Actividad metabólica
- Resistencia a la toxicidad (Annadurai *et al.*, 2008).

1.1.19 Encapsulamiento de la *Pseudomona aeruginosa* con geles de alginato de calcio

Alginato término genérico que se utiliza para denominar a las sales y derivados del ácido algínico. Este polisacárido se presenta como una mezcla de sales insolubles de calcio, sodio, potasio y magnesio en las algas marrones (*Phaeophyta*). El alginato, en forma de sal sódica, potásica o magnésica, es soluble en soluciones acuosas a pH mayores de 3.5. También es soluble en mezclas de agua y solventes orgánicos miscibles con ella, como el alcohol, pero es insoluble en leche, por la presencia de calcio. La viscosidad de las soluciones de alginato depende de la concentración (elevándose mucho a partir del 2%) y temperatura (disminuye al aumentar ésta). Las soluciones de alginato tienen un comportamiento no newtoniano, con una viscosidad que disminuye mucho al aumentar la velocidad de corte. En ausencia de calcio, la molécula de alginato se pliega formando hélices mantenidas por puentes de hidrógeno (Agarry *et al.*, 2014).

1.1.20 Estructura química del alginato de calcio

Los alginatos son polímeros cuyas unidades monoméricas son los ácidos urónicos (azúcares donde el grupo CH₂OH del C6 ha sido reemplazado por un grupo COOH), de unidades: ácido β-D- Manurónico (M) y ácido α-L-Glucurónico (G), obsérvese en la figura 3, estructurado en secuencias de bloques MM, MG unidos por enlaces β-(1-4), y bloques GG, GM unidos por enlaces α-(1-4), obsérvese en la figura 4. Una macromolécula de ácido algínico tiene un peso molecular de 20000 a 250000; heterosacárido no nitrogenado; copolímero de cadena lineal, de fórmula química (C₆H₈O₆)_n (Tyman, 2017).



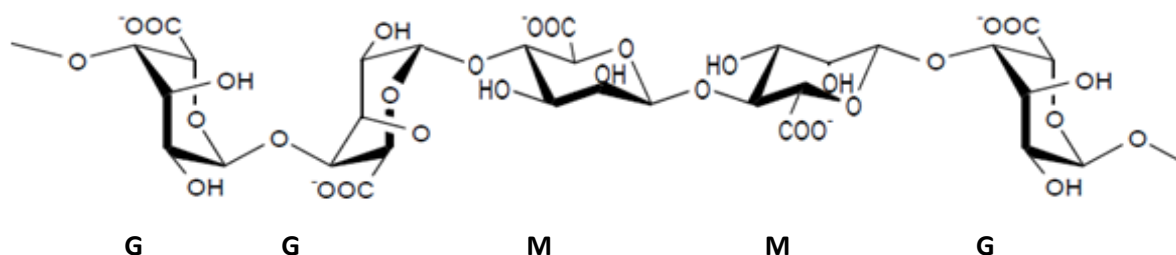


Figura 4. Bloques poliméricos de ácido manurónico (M) y ácido glucurónico (G).
Fuente: Tyman (2017).

1.1.21 Formación del gel de alginato de calcio

Una propiedad interesante de los alginatos es su capacidad para dar geles de texturas muy variadas según el número de zonas de unión entre las macromoléculas. El fenómeno de gelidificación es el resultado de asociaciones intermoleculares, que en el caso de los alginatos no puede llevarse a cabo sin la intervención de reactivos susceptibles de neutralizar las cargas repulsivas de los carboxilatos. La aproximación o apilamiento de cadenas podrá realizarse fácilmente por acidificación del medio o por adición de diversos cationes di o polivalentes de los que el calcio es sin duda el más utilizado. Para obtener un gel de una textura conveniente es importante que el número de zonas de unión creadas por el reactivo reticulante esté comprendido dentro de ciertos límites, ya que una cantidad insuficiente de reticulante se traducirá en un simple aumento de la pseudo plasticidad de la solución y un exceso conducirá a la precipitación coloidal. En los geles de alginato los segmentos homogéneos constituyen las zonas de unión intermolecular. Los iones calcio intervienen para ligar las cadenas paralelas; mediante la interacción de un ión calcio con dos grupos carboxilo, figura 5 (Filloux & Ramos, 2014).

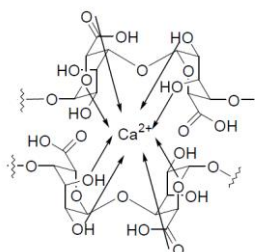


Figura 5. Estructura conformacional: Diagrama representativo de la interacción del ion calcio con los segmentos poliglucurónicos para la formación del gel alginato de calcio.

Fuente: Filloux & Ramos (2014).

El mecanismo de gelidificación es por apilamiento de cadenas que corresponden a un modelo en caja de huevos (figura 6) que se basa en las diferencias de conformación de los tres tipos de secuencias de bloques: poliglucurónicas, polimananurónicas o mixtas. La conformación de las secuencias glucurónicas es tal, que pueden presentar una sucesión de cavidades electronegativas, cuyo tamaño y geometría permiten la fijación de uniones calcio. Se trata de un fenómeno de cooperación de apilamiento regular de las cadenas, y es capaz de ligar muy fuertemente al calcio, como los huevos en sus cajas (Valero, 2015).

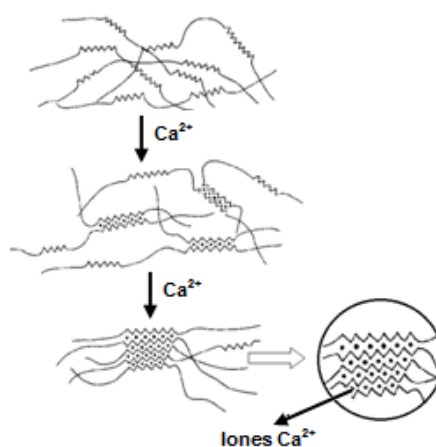


Figura 6. Estructura del alginato de calcio.
Fuente: Valero (2015).

1.2 Antecedentes

1.2.1 Aislamiento e Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*

Pardo *et al.* (2017) aisló bacterias *P. aeruginosa* degradadoras de fenol, utilizó un medio de cultivo, suplementado con 500 mg / L de fenol como única fuente de carbono. El pH se ajustó a 5.0 ± 1 debido a las condiciones de acidez de los suelos de los Llanos Orientales. El fenol se adicionó a partir de una solución madre estéril (filtros 0.22 mm, Minisart NML) de 100 000 mg / L. Las muestras de las biopilas y de los suelos de caña y palma, se procesaron 48 h después de su recolección; (10 g) de cada muestra se colocaron en 100 mL de BH [relación 1:10 (p / v)] y se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y 180 rpm, realizando tres pases al mismo medio BH fresco cada 21 días. Para aislar las cepas promisorias se sembraron diluciones de los cultivos de enriquecimiento en medio BH sólido (1.8 % agar) fortificado con 500 mg / L de fenol como única fuente de carbono y energía, se incubó a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, y

se seleccionaron las colonias que crecieron después de cuatro resiembras consecutivas. Las cepas recuperadas se conservaron en 30 % (v/v) glicerol a -80 °C.

En su investigación Acosta *et al.* (2011) realizó el aislamiento de bacterias inoculando 1.0 mL de las muestras de agua en cajas de Petri conteniendo medio mínimo de Lee, sin glucosa y adicionadas de 1.0 mL de petróleo como fuente de carbono, incubando a 28°C durante 5 días. Las colonias obtenidas se purificaron por resiembras sucesivas en el mismo medio de cultivo, y para su posterior identificación, se sembraron por duplicado en los siguientes medios selectivos: Agar hierro de Kligler, SIM (Sulfhídrico-Indol-Movilidad) y OF (oxidación-fermentación) para *Pseudomonas*, así como Agar Biggy y la prueba de tubo germinal para levaduras. También se realizó toda la batería de pruebas bioquímicas para la identificación de Enterobacterias.

Rivera *et al.* (2008) empleó el medio agar cetrimide, coloración Gram y las pruebas de oxidasa y del citrato para el aislamiento e identificación de *P. aeruginosa*. Se utilizaron los métodos yodométrico para la determinación de BLC y de sinergia con doble disco. De 97 muestras se obtuvieron 20 aislamientos de *P. aeruginosa* (21%); de éstos 45% (9/20).

Pérez *et al.* (2008) aislaron cepas bacterianas *Pseudomonas aureginosa* degradadora de petróleo, esto se llevó a cabo por el método de enriquecimiento secuencial, empleando como fuente de carbono y energía crudo de petróleo Mesa 30/Puerto Escondido El enriquecimiento se realizó empleando medio mineral modificado del medio diseñado por Zajic y col.13 compuesto por (g · L-1): KH₂ PO₄ 0,05; NH₄ Cl 0,1; K₂ HPO₄ 0,1; KH₂ PO₄ 0,05; KCl 0,01; MgSO₄ · 7H₂ O 0,05; CaCl₂ 0,001; FeSO₄ · 7H₂ O 0,001. Además, se le adicionaron 0,05 mL de una disolución de oligoelementos de composición porcentual: B (0,026), Cu (0,05), Mn (0,05), Mo (0,006) y Zn (0,07). Como fuente de carbono se utilizó petróleo intermedio (Mesa 30/Puerto Escondido) 0,2 % (v/v). El aislamiento de las cepas se realizó por siembra en estrías sobre placas de agar triptona soja (TSA), a partir de un banco de diluciones seriadas, las cepas se identificaron utilizando pruebas bioquímicas clásicas para determinar el género y la especie según el Manual Bergey. Las cepas obtenidas fueron depositadas en la Colección de

Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CCEBI), Universidad de Oriente, Santiago de Cuba e identificando a cada una de ellas mediante un código.

Para los aislamiento se utilizaron medios de cultivos selectivos o enriquecidos como lo reporta Hussein *et al.* (2015) los aislamientos bacterianos revelaron una apariencia colonial diferente dependiendo de los medios selectivos o diferenciales utilizados, así mismo Arenas (2018) indica que los resultados de la siembra en medios generales y enriquecidos se desarrollaron a 37°C, esto debido a que en una población de bacterias que se encuentren en crecimiento equilibrado aumentan de manera proporcional con el tiempo.

La tinción de Gram es una coloración que nos ayuda a la identificación de bacterias como lo reportado por Gutierrez (2013) que indica que con la tinción de Gram, se puede apreciar con más definición la morfología de los microorganismos, tamaño y diversidad, como también reporta Arenas (2018) la tinción de Gram realizada sirvió como primer análisis microscópico de las cepas obtenidas y también permitió obtener detalles sobre su estructura interna, cuyas características macroscópicas se complementan con las descripciones, quien indica que este tipo de características corresponden al tipo *Pseudomonas aeruginosa*.

Una prueba de confirmación de cepas bacterianas es el uso de pruebas bioquímicas como lo reporta Pramila (2012) las pruebas bioquímicas utilizadas fueron motilidad, catalasa, oxidasa, carbono, aminoácidos, nitrato. Así también lo indica Begum *et al.* (2015) los aislados bacterianos seleccionados se identificaron mediante caracterización bioquímica como la motilidad y la catalasa, oxidasa, indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, triple azúcar de hierro, utilización de citrato, ureasa, reducción de nitrato y prueba de fermentación de carbohidratos.

Arenas (2018) reporta que las pruebas bioquímicas como oxidasa, TSI, urea, indol y gelatina constituyen pruebas preliminares que se utilizan en la identificación y la inmediata lectura.

El uso de instrumentos o equipos automatizados son muy útiles para la confirmación y validación de cepas bacterianas como lo reporta Hussein *et al.*

(2015) el equipo Vitek 2 es una técnica poderosa para identificar los aislados bacterianos. Así mismo Gutierrez (2013) indica que con ayuda del instrumento Vitek II Compact se sometió a una última prueba de análisis final que comprobaría que se trataba de *Pseudomona aeruginosa*.

1.2.2 Adaptación de microorganismos para la biodegradación de fenol

Pardo *et al.* (2017) aisló cepas de cultivos agrícolas para que fueran evaluadas en tres concentraciones diferentes de fenol (500 mg / L, 800 mg / L y 1 200 mg / L) observándose distintos tiempos de degradación, adaptación al fenol y producción de biomasa. Se observó que el aumento de biomasa está asociado a la disminución de fenol en el medio, indicando que el fenol es utilizado como fuente de carbono. La habilidad de los microorganismos para incorporar fenol para producción de biomasa, está relacionada con la expresión de enzimas (hidroxilasas) asociadas a la degradación del compuesto, lo cual forma catecol que es transformado por medio de las enzimas C230 o C120 a piruvato, para ser utilizado en el metabolismo celular. Entre las cepas aisladas, la cepa Sps1 presentó la mayor tolerancia al fenol, pues lo degradó totalmente en 96 h a la concentración más elevada evaluada (1 200 mg / L); esta concentración inhibió el crecimiento y la degradación de las demás cepas recuperadas de biopilas. Para las cepas aisladas de cultivos agrícolas la concentración de 800 y 1 200 mg / L presentó inhibición de crecimiento y degradación.

Echeverri (2011) estudio el crecimiento bacteriano sobre caldo mineralizado en concentraciones de 200, 500 y 1000mg/L de fenol y procedimiento “directo” se hizo un seguimiento durante 7 días. Se observan mayores absorbancias en las muestras originadas de suelo, comparadas con las muestras de agua (bahía), se observó un aumento considerable de absorbancia a la concentración de 200mg/L, mientras que el aumento al quinto día se vio a 500mg/L; en la concentración de 1000mg/L, hubo coherencia en la absorbancia hasta el tercer día, presentando picos de crecimiento. Al comparar los datos de las absorbancias de las siembras “directas”, “adaptadas” “preenriquecimiento”, en 24, 48 y 72 horas de incubación con concentraciones de fenol de 200, 500 y 1000mg/L se presentó una disminución de la absorbancia a medida que aumentaba la concentración de fenol.

García (2007) menciona que, para realizar la adaptación de lodos activados al fenol, se utilizó el método SCAS, que consiste en que a un litro de lodos activados se le adiciono diariamente 1 litro de agua residual domestica sedimentada y un volumen de solución concentrada de fenol (20 g/l); este último se fue incrementando de acuerdo a la adaptación de los lodos activados. Después de 23 horas de aireación y 45 minutos de sedimentación, se elimina 1 litro de sobrenadante. Para reiniciar el ciclo, se adiciono nuevamente agua residual y solución de fenol. Para mantener estable el proceso de adaptación de fenol, el contenido de solidos totales en el reactor se mantuvo entre 4 – 5 g/l. Con este método, los lodos lograron degradar concentraciones de hasta 1,3 g/l además de que también se logró la adaptación de dos poblaciones de lodos activados para degradar fenol en rangos de concentraciones de 20 – 700 y de 20 – 1300 mg/l utilizando del método SCAS.

En su estudio Kumar *et al.* (2005) menciona que los cultivos liofilizados de *P. putida* (MTCC 1194) se revivieron y se expusieron a concentraciones crecientes de fenol y catecol en matraces de agitación. Esta cepa bacteriana podría aclimatarse a las concentraciones de 1000 y 500 mg / l para fenol y catecol, respectivamente, durante un período de tres meses. Cuanto mayor era la concentración de fenol o catecol, mayor era el período de retraso. El cultivo bien aclimatado de *P. putida* (MTCC 1194) degradó la concentración inicial de fenol de 1000 mg / l y la concentración inicial de catecol de 500 mg / l completamente en 162 y 94 h, respectivamente.

La aclimatación de bacterias en diferentes concentraciones de las sustancias a remediar, es un paso importante en los procesos de tratamiento biológicos como lo reporta Echeverri (2011), encontrándose la adaptación de microorganismos en medios mineralizados con concentraciones de fenol entre 300 y 2000mg/L en la investigación que realizó Jiang *et al.* (2007).

La adaptación de *Nocardiahydrocarboxydans* a concentración de fenol de 500mg/L para su inmovilización y remoción en un reactor de lecho, como también una aclimatación que varió de 100mg/L a 900mg/L en un tiempo de 15 días buscando una tolerancia limite que fue de 900mg/L con el mismo microorganismo Vidya *et al.* (2007). Se estableció una aclimatación de *Bacillus brevis* en medio

mínimo con una concentración de fenol inicial de 500mg/L, y adiciones incrementales a 750mg/L, 1500mg/L y 1750mg/L según lo reportan Shetty *et al.* (2007).

1.2.3 El género *Pseudomonas* como biodegradadores de fenol

Peters *et al.* (2017) investigo nueve cepas de *Pseudomonas* pertenecientes a cuatro especies diferentes (*P. corrugata*, *P. fragi*, *P. stutzeri* y *P. fluorescens* biotipos B, C y F) y que albergan operones de pheBA transferidos horizontalmente. Los genes phe se agruparon de la misma manera en estos nueve phe operons y se conectaron al mismo promotor que en el caso del operón pheBA original. Se secuenciaron un plásmido de 10,6 kb que portaba un grupo de genes pheBA, y se describió la estructura del operón pheBA reordenado. Estos datos indican que el material genético introducido podría, si codifica una capacidad beneficiosa, enriquecer la variedad genética natural para la biodegradación.

Quintana y Valerio (2016) mencionan que el género *Pseudomonas* está constituido por bacilos Gram negativos, móviles por flagelación polar; se encuentran normalmente en el suelo y son patógenos oportunistas en animales, plantas y humanos. Entre los microorganismos del género *Pseudomonas* degradadoras de hidrocarburos y que presentan una serie de actividades naturales sobre xenobióticos, se encuentra la especie *P. aeruginosa*, conocida como bacilo pociánico o de pus azul Ron & Rosenberg (2002). Esta bacteria causa al hombre distintos problemas, pero también tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en un área ambiental. Actualmente se conoce que es uno de los pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada, produce biosurfactantes, útiles para la limpieza de aguas contaminadas con hidrocarburos y además posee la capacidad de absorber metales pesados (Pb, Cr y Zn). Cuando estas bacterias se adhieren a una superficie, las células se diferencian por formar microcolonias cubiertas por una matriz extracelular que eventualmente llegan a constituir una película. Las bacterias que forman la biopelícula tienen un metabolismo distinto a las células que crecen en medios líquidos, una de las diferencias más aparentes es su disminuida sensibilidad a antibióticos y otros agentes tóxicos.

En el trabajo de Mollaei *et al.* (2010), utilizo células de *Pseudomonas sp.* Las células SA01 se inmovilizaron en una serie de técnicas de inmovilización singulares e híbridas para lograr una eliminación de fenol mejorada. Las células inmovilizadas en PVA-alginato y ACA proporcionaron el mejor rendimiento en experimentos con concentraciones elevadas de fenol, hasta 2000 mg / L, con una degradación completa de 2000 mg / L de fenol después de 100 y 110 h, respectivamente. El examen de microscopía electrónica indicó que la capacidad de carga celular aumentó en las perlas híbridas de PVA-alginato a través de una fuga celular reducida, lo que resultó en una mayor actividad de las perlas híbridas de PVA-alginato en comparación con todos los demás métodos de inmovilización.

Kumar *et al.* (2005) realiza la degradación biológica de fenol y catecol por una cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* (MTCC 1194) en medio de sal basal (BSM) se investigó en experimentos con matraces con agitación a $29,9 \pm 0,3$ ° C y un pH de aproximadamente 7,1. Los cultivos liofilizados de *P. putida* (MTCC 1194) se revivieron y se expusieron a concentraciones crecientes de fenol y catecol en matraces de agitación. El cultivo bien aclimatado de *P. putida* (MTCC 1194) degradó la concentración inicial de fenol de 1000 mg / l y la concentración inicial de catecol de 500 mg / l completamente en 162 y 94 h, respectivamente.

1.2.4 *Pseudomonas aeruginosa* y su capacidad para biodegradar fenol

Según Camposano *et al.* (2018) la *P. aeruginosa* crece limitadamente en presencia de fenol en el resultado se muestra el escaso crecimiento de las células libres e inmovilizadas en presencia de fenol y mayor crecimiento en los cultivos a los que no se le agregó el xenobiótico (control), sin embargo, las células son capaces de llevar a cabo la degradación. La degradación de fenol fue mayor en las células inmovilizadas en *Opuntia imbricata* que con células libres. La mejor tasa de biodegradación (T.B.) en células inmovilizadas ocurre a una concentración inicial de fenol 0.016 M logrando 61.6 % de remoción, comparada con el 16.7 % obtenida con células libres. La presencia de fenol limita el crecimiento de *P. aeruginosa* en las diferentes concentraciones probadas. La mejor T.B. se obtuvo en las células inmovilizadas en *Opuntia imbricata* lo que permite proponer tecnología que mejore el proceso de degradación de este xenobiótico.

En el estudio que plantea Bohórquez (2014) donde evalúa la cinética de biodegradación de fenol a partir de *Chlorella vulgaris* – *Pseudomonas aeruginosa*. Se midió el aumento de la biomasa tanto por separado de cada microorganismo y su respectiva degradación de fenol. Para determinar con que cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, se iba a conformar el consorcio, de las siete cepas que se tenían, se realizó una selección de manera cualitativa por medio de la técnica Replica-Plating a dos concentraciones 400 ppm y 800 ppm. Se encontró que, a una concentración de 800 ppm, la concentración de fenol no permitió la recuperación de las bacterias; de las siete cepas, la seleccionada fue la PB18. El porcentaje de remoción de fenol, fue del 50%. Por esta razón, la cinética muestra que aparentemente el consorcio *Chlorella vulgaris* – *Pseudomonas aeruginosa*, funciona mejor como sistema biológico para la remoción de fenol que *Pseudomonas aeruginosa* por si sola. Estos hallazgos sugieren que el consorcio microalga-bacteria podrían jugar un rol fundamental como un nuevo método, amigable con el ambiente, para la remoción de fenol.

En su trabajo de investigación Callata (2014) utilizo *Pseudomonas aeruginosa*, en el proceso de la biodegradación del fenol contenido en soluciones acuosas y en las muestras de aguas residuales provenientes de los retretes de las aeronaves. El estudio de la influencia de los factores ambientales fue posible, mediante un diseño experimental de degradación del fenol en soluciones acuosas con rangos de concentración (30 - 70 mg/L de fenol), temperatura (16 – 28 °C) y matriz (37 - 55 unidades de perlas de alginato de calcio). Se obtuvieron como parámetros más óptimos: temperatura 33 °C, matriz: 62 unidades de perlas de alginato de calcio, concentración inicial 49 mg/L de fenol, eficiencia de remoción del fenol 73.78 %, en un volumen de 300 mL, aireación constante de 0.046 vvm. La degradación del fenol presente en muestras de aguas residuales provenientes de los retretes de aeronaves mediante *Pseudomonas aeruginosa*, obtuvo eficiencias de biodegradación del 78.33 % y 71.26 % para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L en tiempos de contacto de 2.75 y 4.5 h a temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente.

En la investigación de Rangel *et al.* (2010) se usaron células de *P. aeruginosa* para degradar tolueno, benceno y fenol. La cepa fue cultivada en medio mineral sólido y se establecieron las concentraciones óptimas para el desarrollo de células

viables: 0.31, 0.19 y 0.13 M para tolueno, benceno y fenol. Los ambientes con concentraciones limitadas de Fe(III) favorecen la producción de piocianina, pigmento que puede interferir en el método analítico de biodegradación de compuestos aromáticos. Se optimizó y estableció el medio de cultivo mineral con 0.04 g L^{-1} de FeSO_4 en presencia de tolueno (0.03 M) y con esta concentración inicial la tasa de biodegradación fue 75 %. Las pruebas de degradación específicas para los compuestos aromáticos mostraron que la cepa de *P. aeruginosa* usada puede degradar tolueno, benceno y fenol. Las tasas de degradación fueron mayores para tolueno (58.4 %) y benceno (70.11 %) con concentraciones iniciales de 0.14 M y 0.16 M, y la degradación fue menor para fenol (24.65 %) con una concentración inicial 0.10 M. La capacidad degradadora de *P. aeruginosa* tuvo proporción directa con su crecimiento en presencia de los xenobióticos estudiados, mostrando una mayor cantidad de proteína celular en los cultivos con benceno ($1.4982 \text{ mg mL}^{-1}$), tolueno ($0.8629 \text{ mg mL}^{-1}$) y menor en los cultivos desarrollados en presencia de fenol ($0.4431 \text{ mg mL}^{-1}$); lo cual muestra que un deficiente desarrollo bacteriano (biomasa) influye en una subóptima biodegradación.

1.2.5 Otras bacterias biodegradadoras de fenol

Según Pardo *et al.* (2017) menciona que cepas a partir de cultivos agrícolas degradadoras de fenol se inocularon en caldo de soya tríptica (TSB) a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y 120 rpm por 24 h. El cultivo se centrifugó a 5 000 rpm por 5 min y las células fueron lavadas dos veces [0.85 % (p / v) NaCl estéril]. Para evaluar la degradación de fenol, las células, a una densidad óptica de 1.0 a 600 nm (OD_{600}), fueron inoculadas en medio BH a una concentración celular del 0.3 % (v / v) en distintas concentraciones de fenol para las cepas aisladas de biopilas (500 mg / L, 800 mg / L y 1 200 mg / L) y de cultivos de caña y palma (500 mg / L y 800 mg / L), y se incubaron a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ y 180 rpm, hasta agotar la fuente de carbono. Se evaluó la OD_{600} de la biomasa y el fenol residual, por el método de Folin-Ciocalteu. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Se observó que las cepas Sps1 y Sc3 removieron por completo el fenol a 500 mg / L del medio de cultivo a las 24 h y 28 h, respectivamente. Estas cepas, a pesar de requerir un periodo de adaptación más largo a 800 mg / L de fenol, degradaron el compuesto por completo a las 48 h. La cepa Sps1 fue la única que creció a 1 200 mg / L de fenol, removiendo

totalmente el compuesto a las 96 h; para el resto de las cepas esta concentración inhibió su crecimiento.

La *Pseudomonas fluorescencia* KNU417 fue capaz de degradar hasta 700 mg / L de fenol en 65 horas, pero no pudo degradar 1,000 mg / L de fenol. La tasa de degradación del fenol fue notablemente mejorada por la preadaptación. Además, la célula fue capaz de degradar hasta 1,300 mg / L de fenol preadaptando a 700 mg / L de fenol. Adaptaciones repetidas a la misma concentración de fenol muestran un aumento insignificante en tasa de degradación. Además, una concentración relativamente baja del fenol (100–700 mg / L) requirió solo una preadaptación mientras que la alta concentración (1,000 mg / L) tuvo que hacer dos preadaptaciones paso a paso para una degradación óptima (Kwon & Yeom, 2009).

Diferentes técnicas han sido usadas para tratar aguas contaminadas con fenol como: destilación, adsorción, extracción por membrana, ozono, oxidación fotocatalítica, oxidación anódica y degradación biológica, entre otros, como lo indica Busca *et al.* (2008). Hay evidencia de degradación biológica por medio de hongos, bacterias y microalgas; *Pseudomonas sp* y *Aerobacter sp*, *Chlorella sp* *Scenedesmus obliquus*. Se ha visto que los consorcios alga-bacteria son una alternativa viable para la descontaminación de aguas, puesto que se da un reciclaje de nutrientes, las algas consumen el CO₂ producido por las bacterias mientras estas consumen el O₂ que producen las algas (Subashchandrabose *et al.*, 2011).

En este estudio se buscó un medio de cultivo en el que dos cepas de bacterias capaces de crecer con fenol como única fuente de carbono y las algas *Chlorella vulgaris* y *Chlamydomona reinhardtii* pudieran crecer con fenol como sustrato. AMAm fue el medio en el que se vio un mejor crecimiento de las micro-algas. Las bacterias, tuvieron un mejor crecimiento en AMAm, por lo que existe mayores concentraciones de CO₂ que ayudan al crecimiento de las algas. Simultáneamente el alga genera mayor concentración de O₂ que beneficiaría el crecimiento de las bacterias. Hay que mencionar además que la presencia de oxígeno favorece la degradación de fenol (Melo *et al.*, 2005). Dentro de las micro-algas se tienen un crecimiento mixotrófico, donde utiliza el fenol como fuente de carbono, pero siguen usando la luz. Esto significa un mejor crecimiento de las algas que

beneficiaría el proceso (Mitra *et al.*, 2012). Los medios RS y AMAm soportaron el crecimiento de las algas de manera autotrófica, así como el crecimiento de los consorcios a concentraciones de 50 y 100 mg/L de fenol (Cantillo, 2017).

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema

Las aguas residuales de los baños portátiles son consideradas aguas residuales industriales. La alta carga contaminante entre los principales y más tóxicos, los compuestos fenólicos de las aguas residuales procedentes de los baños portátiles, hace que sea necesario y obligatorio el tratamiento adecuado antes de verterlo en los sistemas de alcantarillado sanitario. Los contaminantes allí presentes alteran las composiciones y características físicas, químicas y biológicas de un desagüe doméstico, lo que traslada el problema al cuerpo receptor, al no poder este, de manera natural degradar estos compuestos altamente tóxicos para el ecosistema. La acumulación de estos compuestos químicos tóxicos en el cuerpo receptor produce alteraciones en las propiedades biológicas de los microorganismos que habitan en él (Bódalo *et al.*, 2008).

La remoción del fenol ha sido realizada mediante procesos físicos y químicos con derivados secundarios, sin embargo, las técnicas biológicas tienen una gran ventaja como la remoción total por medio de la mineralización completa en CO_2 , H_2O , NO_3^- , con costos de operación bajos, donde la degradación completa puede ser realizadas por bacterias, hongos y levaduras que utilizan el fenol como fuente de carbono y energía (Naresh *et al.*, 2012).

Sin embargo los compuestos xenobióticos como el fenol pueden contribuir con la inestabilidad de los sistemas de tratamientos biológicos de aguas residuales que inhiben a los microorganismos actuadores en la degradación de materia orgánica y otros compuestos, por lo tanto, estos compuestos disminuyen la eficiencia de las plantas de tratamiento de aguas residuales, así como el fenol que es de efecto bactericida que se basa

en la interrupción de las funciones de las membranas citoplasmáticas de los microorganismos causando así la muerte de ellos. Por tanto, para minimizar este problema se han aislado bacterias extremófilas que degraden el fenol como la *Pseudomonas aeruginosa* que han sido adaptadas a diferentes concentraciones de fenol (7 a 1400 mg/L) y enriquecida con medios suplementarios de crecimiento (Ren *et al.*, 2008).

Por otra parte, los efluentes líquidos con contenido de fenol a altas concentraciones hacen imposible descargar directamente a la red pública y/o sistema de tratamiento biológico convencional por lo que el presente estudio pretende optimizar el porcentaje de remoción del fenol en un sistema biológico (Rodríguez *et al.*, 2013).

2.2 Enunciados del problema

2.2.1 Problema general

¿Cuál será la capacidad de degradación del fenol de aguas residuales de baños químicos portátiles mediante *Pseudomonas aeruginosa*?

2.2.2 Problemas específicos

- ¿Cómo aislar bacterias con capacidad degradativa de fenol?
- ¿Cómo adaptar la bacteria aislada a diferentes concentraciones crecientes de fenol?
- ¿Cuál será la capacidad de biodegradación de la bacteria inmovilizada en una matriz de alginato de calcio?

2.3 Justificación

El presente trabajo estudia la solución del problema del tratamiento adecuado de las aguas residuales de los baños portátiles del sector construcción, al permitir reducir la contaminación de estos efluentes antes de verterlos a las líneas de desagüe de la ciudad u otros cuerpos receptores. En el Perú, en instituciones como DIGESA o el Ministerio del Medio Ambiente no existe información o una base de datos sobre el tipo de tratamiento o la disposición final de las aguas residuales producto de los alquileres de los baños portátiles (Quicaño, 2014).

Los efluentes residuales de los baños portátiles son consideradas aguas residuales industriales. Estas aguas son descargadas a la red de desagüe municipal sin tratamiento alguno y muy pocas le dan el tratamiento primario e insuficiente en pozos sépticos, como se pudo comprobar en las empresas que brindan el servicio de alquiler de estos baños

portátiles. Los efluentes con alta carga química y tóxica de los baños portátiles son vertidos a la línea de desagüe municipal sin un tratamiento adecuado previo, y como consecuencias directas de estas acciones, contaminan los cuerpos receptores, disminuyen la posibilidad de un tratamiento biológico aguas abajo, provocan acumulación de compuestos xenobiótico en los ecosistemas marinos, bioacumulación, alteran las propiedades fisicoquímicas de los cuerpos receptores, disminuyen la vida útil de las líneas que trasladan estas aguas residuales entre otras. Los generadores de aguas residuales industriales aún no incorporan la opción del tratamiento adecuado y el reúso por las siguientes razones:

- No existe conciencia del enfoque integral del manejo de las aguas residuales industriales para alcanzar el desarrollo sostenible de la ciudad.
- El empresario local no ha comprendido que los efluentes debidamente tratados y reusado en sus propios procesos productivos tiene un alto ahorro económico, al dejar de usar agua limpia con costos elevados.
- La legislación sobre tratamiento de aguas residuales industriales y especialmente sobre el reúso de este recurso es aún muy limitada.
- La poca participación activa de la comunidad y de los especialistas en la elección de tecnologías apropiadas para tratar las aguas residuales industriales, permite que las empresas adopten tecnologías de alto costo y que no logran las exigencias de calidad sanitaria requeridas para su reúso. Inclusive por el alto costo no incluyen en su plan de trabajo tratar los efluentes de su proceso industrial (Quicaño, 2014).

Las empresas que utilizan los baños químicos portátiles como un negocio prospero, además de los usuarios finales, deben preocuparse por el impacto ambiental que se genera cuando descargan las aguas residuales de estos baños portátiles a la línea de desagüe municipal sin tratamiento previo.

El fenol es un compuesto tóxico que tiene impactos negativos en la flora y fauna. Además, el fenol es un compuesto tóxico para el ser humano ya que estas afectan las funciones vitales. También es la causa de problemas de sabor y olor en agua potable en concentraciones bajas. En aguas muy contaminadas el fenol puede encontrarse desde concentraciones de 1.5 mg/L a 4.5 mg/L. El fenol es muy tóxico para peces y letal a concentraciones de 5 a 20 mg/L, sin embargo, a concentraciones bajas de 0.1 mg/L el agua que rodea afecta el sabor del pescado. Por otro lado, la Agencia de Protección Medio

Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) considera a nueve los fenoles contaminantes prioritarios y los califica como químicos persistentes y bioacumulativos (McBride, 2018). La investigación busca entonces que *Pseudomonas aeruginosa*, un microorganismo que se caracteriza por poseer una extrema versatilidad metabólica que en condiciones ambientales adecuadas de temperatura podría degradar al fenol presente en aguas residuales de baños químicos, en un 70%. Para ello se tiene como propósito principal de este estudio la evaluación de la capacidad degradativa del fenol presente en aguas residuales mediante *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en matrices de alginato de calcio.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

Evaluar la degradación del fenol de aguas residuales de baños químicos portátiles mediante *Pseudomonas aeruginosa*

2.4.2 Objetivos específicos

- Aislar bacterias con capacidad degradativa de fenol.
- Adaptar la bacteria aislada a diferentes concentraciones crecientes de fenol.
- Evaluar la capacidad de biodegradación de la bacteria inmovilizada en una matriz de alginato de calcio.

2.5 Hipótesis

2.5.1 Hipótesis general

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* tiene capacidad degradativa frente al fenol presente en aguas residuales de baños químicos portátiles

2.5.2 Hipótesis específicas

- Las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* aisladas, tienen capacidad biodegradativa frente al fenol.
- La bacteria tiene mayor actividad degradativa cuando se adapta a diferentes concentraciones crecientes de fenol.
- Las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas, tienen capacidad biodegradativa frente al fenol.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

La zona de estudio está ubicada a 35,6 km de la ciudad de Puno, trayecto autopista Puno - Juliaca, zona industrial, próximo a la autopista, Distrito de Caracoto, Provincia de San Román y Departamento de Puno, sus coordenadas geográficas en la Tabla 7.

Tabla 7

Ubicación de zona de estudio y punto de muestreo

N°	Código del punto	Estación de muestreo	Coordenadas de campo de estudio		Descripción de investigador
			Longitud	Latitud	
1	MF1	1F	-15.573170	-70.102612	Baño químico portátil

El lugar se encuentra específicamente en la planta de la empresa Concretos Supermix S.A.; donde la empresa Ecovida Grupo Inmobiliario S.A.C., en su obra “Construcción de Infraestructura en Nueva Planta Caracoto – Concretos Supermix” viene realizando una obra de construcción. En la ejecución de esta obra se contrató los servicios de baños químicos portátiles para uso de trabajadores, los que fueron objeto de estudio.



Figura 7. Mapa de la ciudad de Caracoto con indicación de la zona de muestreo
Fuente: Google maps (2019).

3.2 Población

La población está representada por 01 baños químicos portátiles, el cual se encuentran correctamente anclado al suelo y en un lugar de fácil acceso (Figura 8).



Figura 8. Baño químico portátil

Aproximadamente el número de trabajadores es de 30 entre personal permanente y personal que accede a la planta por trabajos eventuales, cada trabajador, en promedio usa los baños químicos portátiles 10 veces al día (observación del investigador), esto porque los trabajadores se hidratan con agua permanentemente por el desgaste físico que realizan.

3.3 Muestra

El procedimiento de toma de muestra fue aleatorio y por conveniencia, porque es de interés global conocer los posibles efectos de contaminación de fenol en un cuerpo de agua, para ello se tomó el caso de los baños químicos portátiles de la empresa Ecovida Grupo Inmobiliario S.A.C. en su obra “Construcción de Infraestructura en Nueva Planta Caracoto – Concretos Supermix”, dicha obra fue elegida, previo acuerdo del investigador y el gerente de la empresa para ser objeto y sujeto de análisis. Se recolecto muestras de agua residual del baño químico portátil para posterior ser llevadas al laboratorio. Las variables fueron determinadas en el laboratorio de investigación de la Facultad de Ingeniería Química para el aislamiento de la bacteria y su posterior acondicionamiento y otras muestras fueron enviadas a los Laboratorios Analíticos del Sur de la ciudad de Arequipa para determinar los niveles de concentración de fenol (Anexo 1). El procedimiento de toma de muestras y su manipulación estuvo basado en el “Protocolo Nacional de Monitoreo de la Calidad del Agua” y de conformidad a los Estándares de Calidad Ambiental y lo recomendado por otras investigaciones de la comunidad científica (Archundia *et al.*, 2017).

Tabla 8

Método de ensayo utilizados por el laboratorio LAS, para el análisis de concentración de fenol

Parámetro	Método de ensayo	Rango
Fenol	Método de ensayo estándar para fenoles en agua por fotometría	[0.001 - 10] mg/L

Fuente: LAS (2019)

3.4 Método de investigación

La investigación fue cuasi experimental, los parámetros químicos del agua residual recolectados fueron sometidos a pruebas, mediante procedimientos, técnicas de comparación con los límites de tolerancia de los ECAs. Los resultados obtenidos, fueron de manera ordenada y sistemática en concordancia con los considerandos del Estándares de Calidad Ambiental y del Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales establecida por Resolución Jefatural N° 010-2016-ANA (El Peruano, 2017).

3.5 Descripción detallada de métodos por objetivos específicos

Para alcanzar el OE1: Aislamiento de bacterias con capacidad degradativa de fenol.

La metodología utilizada para la identificación de bacterias con capacidad degradativa de fenol se realizó en cuatro fases: de campo, pre analítica, analítica y post analítica.

Materiales y equipos. Microscopio óptico compuesto, autoclave, incubadora de 37°C, contador de colonias.

Reactivos. Kit para tinción de Gram.

Medios de cultivo: agar Tripticasa de Soya, agar MacConkey, agar Cetrimide, caldo nutritivo, agar nutritivo, kit para pruebas bioquímicas TSI (agar hierro triple azúcar), LIA (agar lisina hierro), citrato de Simmons, urea.

a. Fase de campo

La obtención de cepas microbianas fue a partir de muestras de aguas residuales provenientes de los baños químicos portátiles de la empresa Ecovida Grupo Inmobiliario S.A.C., en su obra “Construcción de Infraestructura en Nueva Planta Caracoto – Concretos Supermix”, luego se colocaron en frascos de vidrio y se trasladaron al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Humana para su procesamiento.

b. Fase pre analítica

Preparación de muestras y medios de cultivo

La preparación del material fungible se realizó en el laboratorio, luego se preparó los medios de cultivo como son agar Tripticasa de soya (TSA), agar MacConkey (MC), agar Cetrimide (AC), kit para pruebas bioquímicas (TSI, LIA, citrato, urea).

c. Fase analítica

Se desarrollaron dos clases de siembra y por duplicado cada una para las muestras, el primero compuesto por; agua del baño químico del lugar; el segundo compuesto por; agua una vez utilizado el baño químico. El crecimiento de bacterias se realizó en medio de cultivo agar Tripticasa de soya, en medio selectivo agar Mac Conkey y agar Cetrimide (Koneman & Allen, 2008).

Se tomó una muestra de las colonias de bacterias de las placas Petri con agar TSA y se realizaron repiques en agar MacConkey y agar Cetrimide y se incubaron a 37°C por 24 - 72 horas, para obtener cultivos puros (Koneman & Allen, 2008).

Tinción Gram: Para la identificación y observación microscópica, se realizó la tinción de Gram con la finalidad de observar la morfología característica de *Pseudomonas aeruginosa* (Koneman & Allen, 2008).

d. Fase post analítica

Esta fase corresponde a las lecturas finales y de confirmación, se utilizó el kit de pruebas bioquímicas (TSI, LIA, citrato, urea) y se hizo una lectura con las tablas de comparación para identificar a *Pseudomonas aeruginosa*.

Validación: Para validar la identificación de la cepa aislada, se trasladó la muestra a las instalaciones del hospital ESSALUD de Salcedo y con el equipo WalkAway 96 Plus se sometió a una última prueba para comprobar y validar la cepa bacteriana.

Para alcanzar el OE2: Adaptación de la bacteria aislada a diferentes concentraciones crecientes de fenol.

Materiales y equipos. Autoclave, incubadora de 37°C, contador de colonias.

Reactivos. Fenol

Medios de cultivo: Caldo nutritivo, agar nutritivo, medio mineral.

a. Fase pre analítica

Preparación de muestras y medios de cultivo

La preparación del material fungible se realizó en el laboratorio, luego se preparó los medios de cultivo como son caldo nutritivo, agar nutritivo y medio mineral.

El medio mineral utilizado como técnica de enriquecimiento en medio líquido ha sido el medio de Fatherpure y Vogel, empleado para el aislamiento de microorganismos que se encontraran en aguas residuales, con una modificación por conveniencia, macronutriente (mg/L) en agua desionizada: K₂HPO₄, 900; KH₂PO₄, 450; NH₄Cl, 450; NaCl, 900; MgSO₄, 210; CaCl₂.2H₂O, 20; FeCl₂, 5.0, fuente de carbono y energía: extracto de levadura, 1 mg/L (Fatherpure & Vogel, 2015).

b. Fase analítica

De las cepas identificadas, se hicieron ensayos de adaptación de 7 a 1400 mg/L de concentración de fenol, con la siguiente metodología.

Cultivo Primario. Se sembraron las cepas identificadas en 5 mL de caldo nutritivo. En cada fiola de 50mL, se colocaron 5mL del cultivo bacteriano seguidamente se adicionaron 10 mL de medio mineral (medio mineral modificado de Fatherpure y Vogel) y 35 mL de la solución acuosa de 7 mg/L de fenol (solución previamente autoclavada), seguidamente se incubaron a 37 °C por 72 horas. Finalmente, se traspasó a tubos Falcon que se centrifugaron a 5000 rpm por 30 min, la precipitación celular de cada tubo Falcon se colectó para los siguientes ensayos experimentales (Fathepure & Vogel, 2015).

Cultivo Secundario. En cada fiola de 50mL, se adicionó 5mL del cultivo primario (células precipitadas), a este se le incorporó 10 mL de medio mineral, y 35 mL de solución de 35 mg/L fenol, seguidamente se incubaron a 37 °C por 72 horas. Finalmente, se centrifugaron a 5000 rpm por 30 min. Los ensayos experimentales posteriores se continuaron con el procedimiento mencionado, con adiciones de concentraciones de 70, 350, y 700 mg/L de fenol, se incubaron a 37 °C por 72 horas para cada uno; y para concentraciones adicionales de 1050 y 1400 mg/L de fenol, se incubaron a 37 °C por 168 horas para cada uno (Fathepure & Vogel, 2015).

c. Fase post analítica

Del último ensayo se tomó una alícuota de 1 mL de cada muestra y se realizó diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} para las siembras bacteriológicas en agar nutritivo, con el método de recuento en placa.

Para alcanzar el OE3: Evaluación de la capacidad de biodegradación de la bacteria inmovilizada en una matriz de alginato de calcio.

Materiales y equipos. Motor aireador de 220-240V.

Reactivos. Alginato de calcio, cloruro de calcio.

Medios de cultivo: Caldo nutritivo, medio mineral.

a. Fase pre analítica

Preparación de muestras y medios de cultivo

La preparación del material fungible se realizó en el laboratorio, luego se preparó el medio mineral y el cloruro de calcio.

Encapsulamiento en geles de alginato de calcio: La inmovilización de los microorganismos se realizó por atrapamiento de bacterias, durante la formación de la matriz de alginato de calcio. La cepa seleccionada se resembró en caldo nutritivo para su utilización (Chang *et al.*, 2001).

b. Fase analítica

Inmovilización en alginato de calcio: En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se disolvió 2.4 gr. de ácido algínico (2.4% w/v) con 100 mL de medio mineral modificado de Fatherpure y Vogel, seguidamente se esterilizó. A esta solución se le agregó 1.5 mL de la cepa seleccionada, luego se agitó el matraz hasta su completa homogenización (Chang *et al.*, 2001).

La solución homogénea se transfirió a una micropipeta, y se dejó gotear la solución algínica con bacterias en 100 mL de cloruro de calcio (al 2.4%, de pH 6,0) previamente esterilizada. La altura de la caída de la gota fue de 5 cm, para la formación de la perla. Finalmente, fueron lavadas con 100 mL de agua destilada para remover el exceso de iones de calcio (se lavaron 2 veces, cada uno por 20 minutos).

c. Fase post analítica

Cuantificación del fenol: Para cuantificar la concentración de fenol, se recolecto muestra de agua residual del baño químico portátil. En el punto muéstral se recolecto muestra de agua residual para posterior ser llevadas a los Laboratorios Analíticos del Sur de la ciudad de Arequipa, se siguió el procedimiento que tiene dicho laboratorio para la toma de muestra, este contempla la cadena de custodia que proporciona el mismo laboratorio (Figura 9, Anexo 1).

Todas las muestras se recolectaron a 0.32 cm de profundidad en el inodoro del baño químico portátil, la cantidad fue de 150ml, para determinación del parámetro químico de la concentración de fenol (Tabla 10; Figura 10, anexos 1 y 2). Todas las muestras recolectadas de agua residual de la zona de muestreo fueron preservadas, rotuladas y transportadas en una caja térmica con hielo hasta los Laboratorios Analíticos del Sur de la ciudad de Arequipa. Todos los procedimientos siguieron los protocolos establecidos por el Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos

Superficiales aprobado por la Resolución Jefatura N° 010-2016-ANA (ANA, 2019; El Peruano, 2017).

El método empleado por los Laboratorios Analíticos del Sur para la determinación de la concentración de fenol es el de “Método de ensayo estándar para fenoles en agua por fotometría”, método fotométrico directo 5530 D del “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (APHA *et al.*, 2005). Este método es aceptado oficialmente para la determinación de compuestos fenólicos (Beltrame *et al.*, 1980); La determinación se fundamenta en la capacidad de los compuestos fenólicos destilables para reaccionar con la 4-aminoantipirina a pH $7,9 \pm 0,1$ en presencia de hexacianoferrato de potasio, para formar un complejo estable coloreado de antipirina. Este colorante se mantuvo en solución acuosa y se midió la absorbancia a 500 nm, en un espectrofotómetro. Se estableció una curva de calibración previa a cada medida, se cuantificó la concentración de fenol en los medios de cultivo líquidos con fenol y en el efluente sintético tratado con el cultivo inmovilizado. Para elaborar las soluciones de referencia, se titularon las soluciones patrón de fenol por retroceso con yodo por titulación con un estándar de tiosulfato de sodio, en presencia de bromo. La presencia de la solución bromuro-bromato en medio ácido generó bromo libre, el cual se adicionó en el anillo fenólico para producir 2,4,6 tribromofenol. El exceso de bromo reacciono con el yoduro de potasio generando yodo y bromuro de potasio - método 5530 C (APHA *et al.*, 2005).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento de bacterias con capacidad degradativa de fenol

El aislamiento primario se realizó en el medio de cultivo Agar Tripticasa Soya (TSA), que es un medio general y es adecuado para el aislamiento de todo tipo de bacterias grampositivas y gramnegativas, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas siendo consideradas muestras positivas las que no fueron contaminadas por mohos y hongos, para las 72 horas, el aislamiento secundario se realizó en agar MacConkey, que es un medio de diferenciación selectivo para el aislamiento y la diferenciación de bacilos Gram negativos, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas. Se seleccionó las placas con mejores características morfológicas y se realizó un repique en agar Cetrimide, que es un medio selectivo para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa*, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas como se muestra en la tabla 9. Se seleccionó las placas con mejores características morfológicas y de color para la identificación de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* para las 72 horas.

Tabla 9

Crecimiento en medios de cultivo

Placa	Tiempo		
	24 horas	48 horas	72 horas
1TSA	+	++	+++
2TSA	-	-	-
3TSA	+	+	++
4MC	+	++	+++
5MC	+	++	+++
6MC	+	++	+++
7C	+	++	+++
8C	+	++	+++
9C	+	++	+++

La tabla 9, muestra los resultados de la siembra y aislamiento en medios generales (1,2,3) y selectivos (4,5,6,7,8,9), en los cuales el crecimiento de colonias se desarrolló casi de la misma manera, la diferencia estuvo en el aumento de la velocidad de crecimiento de las cepas de acuerdo al tiempo de incubación. En la tabla 10 se puede apreciar el crecimiento óptimo a las 72h a 37°C.

Tabla 10

Crecimiento bacteriano en un tiempo de 24 a 72 horas

Medio de cultivo	24 horas colonias (UFC)	48 horas colonias (UFC)	72 horas colonias (UFC)
1TSA	21 x 10 ⁶	70x 10 ⁶	112 x 10 ⁶
2TSA	0	0	0
3TSA	14 x 10 ⁶	26 x 10 ⁶	60 x 10 ⁶
4MC	27 x 10 ⁶	65 x 10 ⁶	98 x 10 ⁶
5MC	26 x 10 ⁶	74 x 10 ⁶	80 x 10 ⁶
6MC	24 x 10 ⁶	60 x 10 ⁶	80 x 10 ⁶
7C	23 x 10 ⁶	70 x 10 ⁶	120 x 10 ⁶
8C	18 x 10 ⁶	68 x 10 ⁶	94 x 10 ⁶
9C	21 x 10 ⁶	60 x 10 ⁶	90 x 10 ⁶

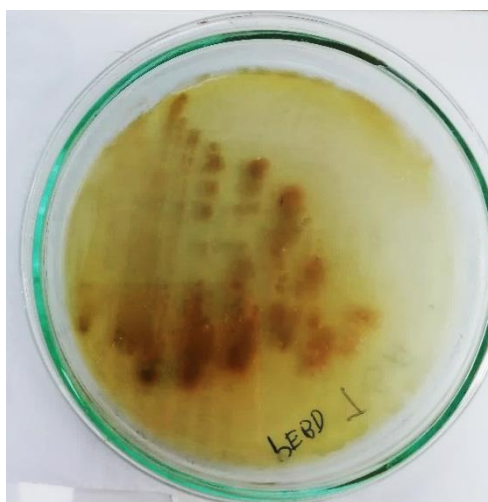


Figura 9. Crecimiento de bacterias en Agar TSA a las 72 horas a 37°C

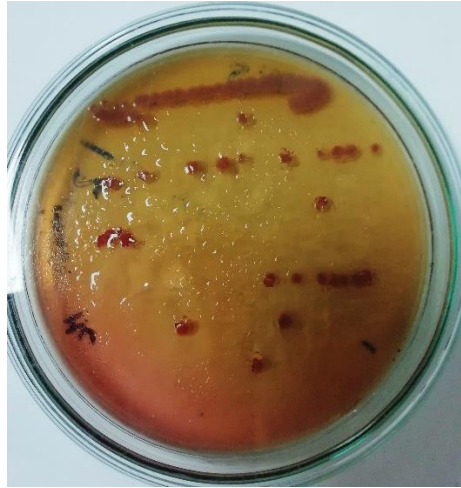


Figura 10. Crecimiento de bacterias en Agar MacConkey a las 48 horas a 37⁰C

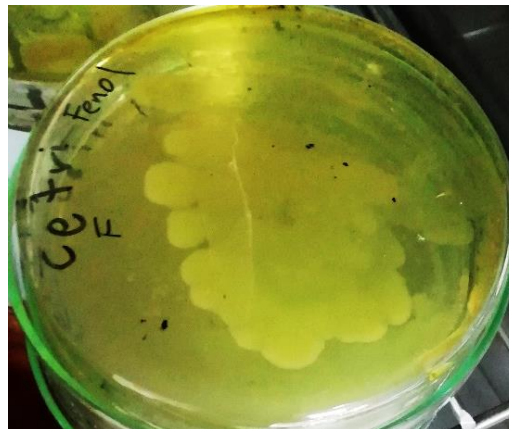


Figura 11. Crecimiento de bacterias en Agar Cetrimide a las 72 horas a 37⁰C

La Figura 9, 10 y 11 muestran el crecimiento en medio de cultivo TSA, MacConkey y Cetrimide en 24 y 72 horas a 37°C, esto debido a que en una población de bacterias que se encuentren en crecimiento aumentan de manera proporcional con el tiempo.

Todas las cepas obtenidas fueron sometidas a tinción de Gram (Figura 12), mediante la cual se realizó el primer reconocimiento de las bacterias Gram negativas, de este primer ensayo se seleccionaron sólo a bacterias que tenían la forma de bastones, esto confirma que las cepas tienen la característica de ser *Pseudomonas aeruginosa*.

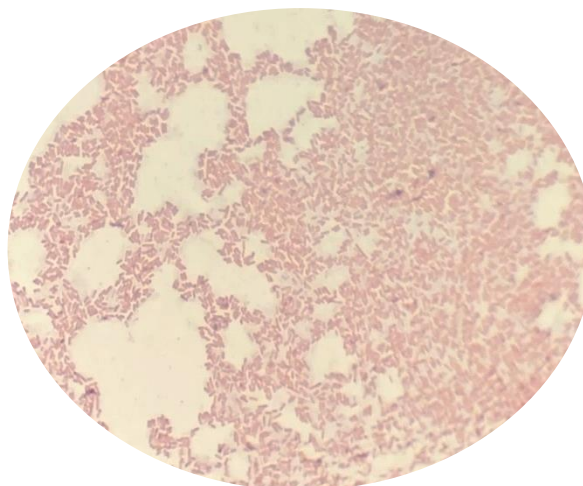


Figura 12. Tinción de Gram: bacilos gramnegativos

Referido a los resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* observamos la Tabla 11.

Tabla 11

Pruebas bioquímicas para identificación Pseudomonas aeruginosa

Citrato de Simmons	Desaminación	LIA		TSI			UREA
		Descarboxilasa	Hierro	Lactosa	Sacarosa	Glucosa CO ₂	
+	-	+	+	k	K	-	-



Figura 13. Resultado de las pruebas bioquímicas (Citrato, LIA, TSI y urea).

Los resultados obtenidos de las pruebas de reconocimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* por medio de ensayos de tinción gram, medios de cultivo y pruebas bioquímicas descritas en la tabla 9, 10 y 11, se observaron que poseen características de ser Gram negativa, crecieron en el medio TSA con pigmentación amarilla, en medio MacConkey con coloración rosada y en Agar Cetrimide, con características físicas morfológicas con forma circular con elevación plano de superficie lisa y brillante, y de

consistencia mucosa. Utilizaron al citrato como fuente de carbono (Citrato de Simmons positivo), crecieron en medio LIA por lo que son sideróforo, no fermentaron lactosa, sacarosa, glucosa (resultado de TSI negativo), no sintetizaron la urea (resultado de UREA negativo).

El aislamiento coincidió con Rivera *et al.* (2008), quienes emplearon el medio agar cetrimide, coloración Gram y las pruebas de oxidasa y del citrato para el aislamiento e identificación de *P. aeruginosa*.

Por otro lado la caracterización concuerda con lo reportado por Ruiz (2007); Ortíz *et al.* (2004) quienes describen a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* de ser bacilos Gram negativo, que se presentan amarillo-verdoso por la producción de pioverdina, se considera como sideróforo pertenece al grupo heterogéneo denominado no fermentadores, descarboxilan Llisina hasta CO₂ y H₂O vía cadaverina, Revellés *et al.* (2005) con morfología colonial alargada y plana, con el centro elevado, de crecimiento en medio sólido con producción de mucoide como consecuencia de sobreproducción de alginato.

4.2 Adaptación de las bacterias a diferentes concentraciones de fenol

La adaptación de bacterias se desarrolló de forma gradual con incrementos de dosificación de fenol químicamente puro en concentraciones de 7, 35, 70, 350, 700, 1050, y 1400 mg/L como se aprecia en la tabla 12, en medio mineral de Fatherpure y Vogel (20%) con 10% de cultivo de cepas, en un periodo de 24 a 168 horas (1-7 días).

Tabla 12

Crecimiento de colonias en agar nutritivo

Concentración de fenol (mg/L)	24 horas colonias (UFC)	48 horas colonias (UFC)	72 horas colonias (UFC)	96 horas colonias (UFC)	120 horas colonias (UFC)	144 horas colonias (UFC)	168 horas colonias (UFC)
7	24 x 10 ⁶	61 x 10 ⁶	112 x 10 ⁶	131 x 10 ⁶	177 x 10 ⁶	201 x 10 ⁶	220 x 10 ⁶
35	21 x 10 ⁶	57 x 10 ⁶	108 x 10 ⁶	121 x 10 ⁶	171 x 10 ⁶	197 x 10 ⁶	211 x 10 ⁶
70	18 x 10 ⁶	53 x 10 ⁶	102 x 10 ⁶	117 x 10 ⁶	169 x 10 ⁶	191 x 10 ⁶	203 x 10 ⁶
350	16 x 10 ⁶	51 x 10 ⁶	98 x 10 ⁶	101 x 10 ⁶	150 x 10 ⁶	188 x 10 ⁶	199 x 10 ⁶
700	12 x 10 ⁶	47 x 10 ⁶	80 x 10 ⁶	97 x 10 ⁶	127 x 10 ⁶	172 x 10 ⁶	190 x 10 ⁶
1050	5 x 10 ⁶	18 x 10 ⁶	27 x 10 ⁶	38 x 10 ⁶	51 x 10 ⁶	67 x 10 ⁶	83 x 10 ⁶
1400	3 x 10 ⁶	11 x 10 ⁶	21 x 10 ⁶	34 x 10 ⁶	47 x 10 ⁶	59 x 10 ⁶	76 x 10 ⁶
Promedio del crecimiento de colonias de bacterias	14142857.1	42571428.6	78285714.3	91285714.3	127428571	153571429	168857143
Desviación estándar	7904188.16	19780943.2	38482525.4	39516723.4	56130375.4	62582897.4	61788425.5

El número de colonias crecidas en placas de medio agar nutritivo, nos permitió observar el crecimiento de la bacteria en las diferentes concentraciones de fenol, se fue observando cada día por un lapso de 7 días y así se evidenció su adaptación como se aprecia en las figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20.

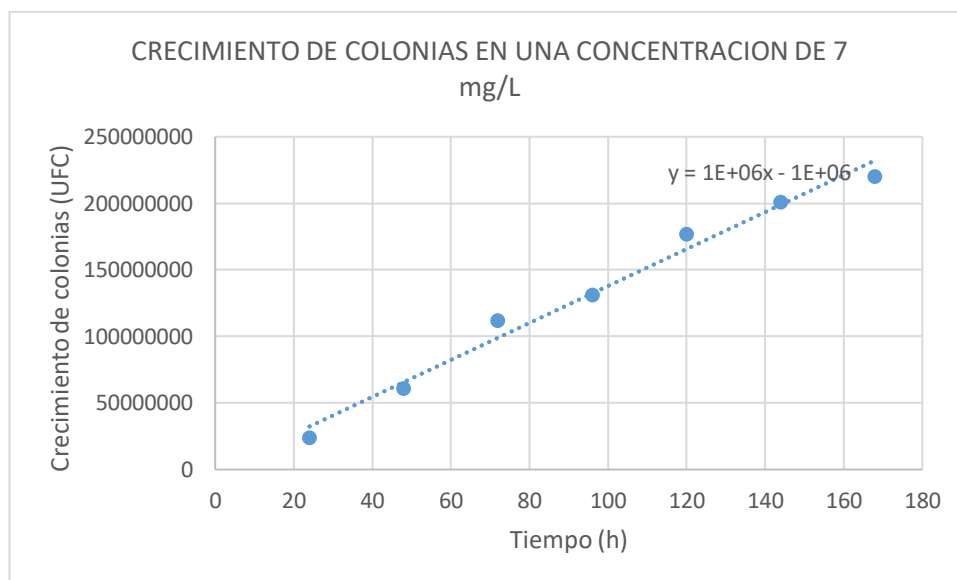


Figura 14. Crecimiento de colonias en concentración de 7mg/L.

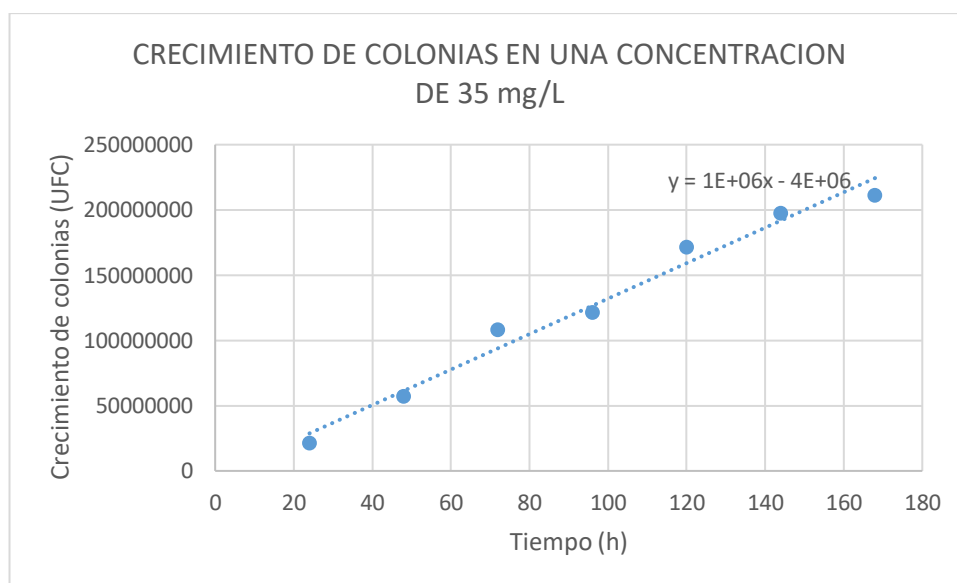


Figura 15. Crecimiento de colonias en concentración de 35mg/L.

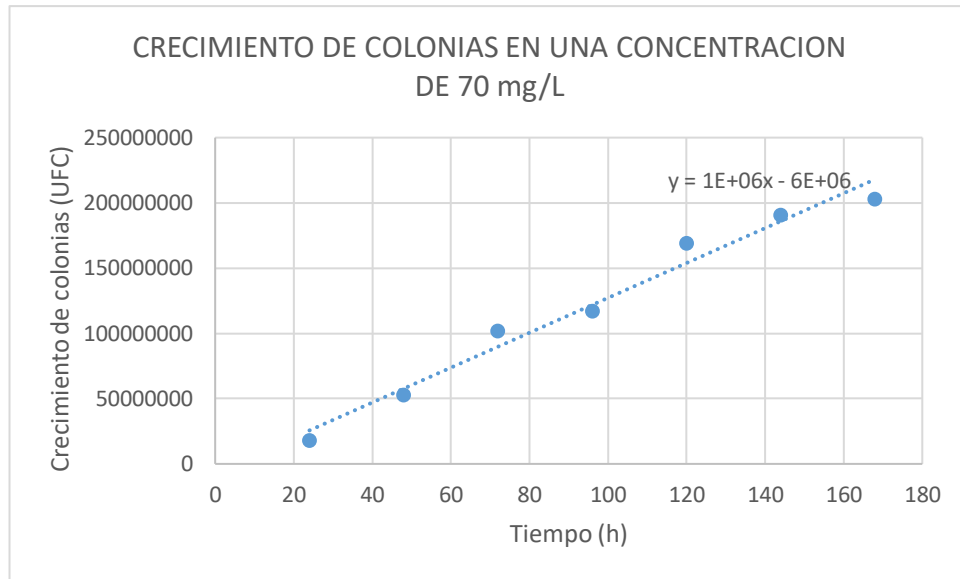


Figura 16. Crecimiento de colonias en concentración de 70 mg/L.

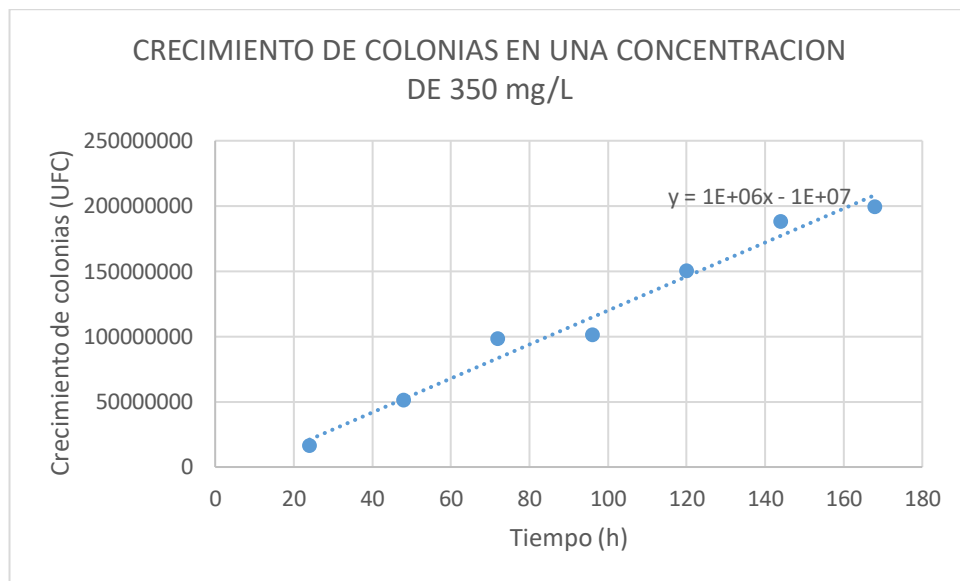


Figura 17. Crecimiento de colonias en concentración de 350 mg/L.

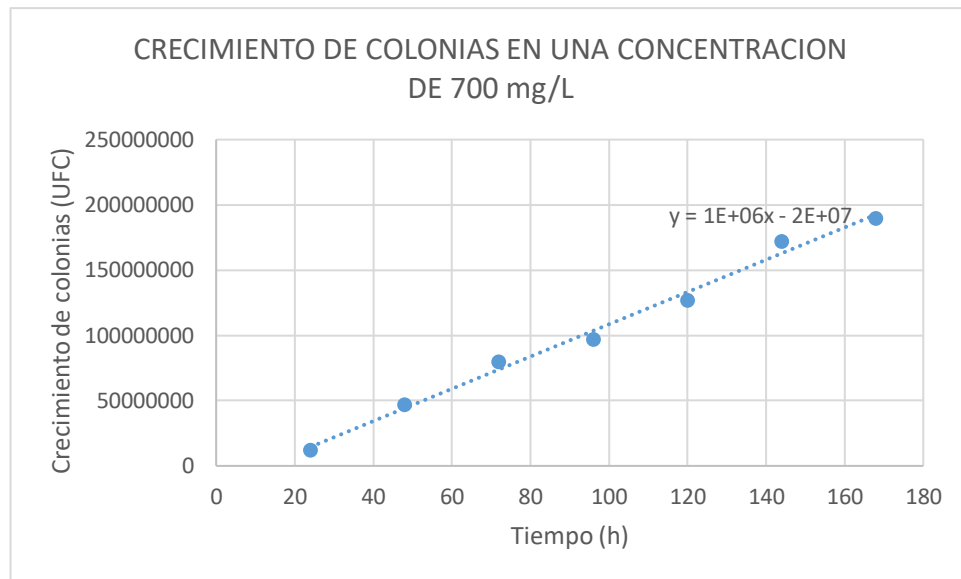


Figura 18. Crecimiento de colonias en concentración de 700 mg/L.

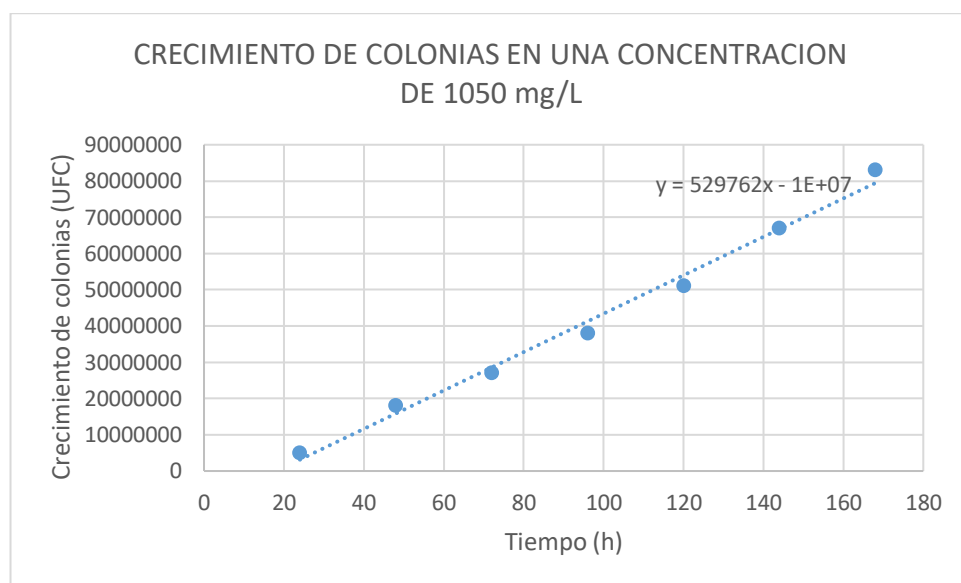


Figura 19. Crecimiento de colonias en concentración de 1050 mg/L.

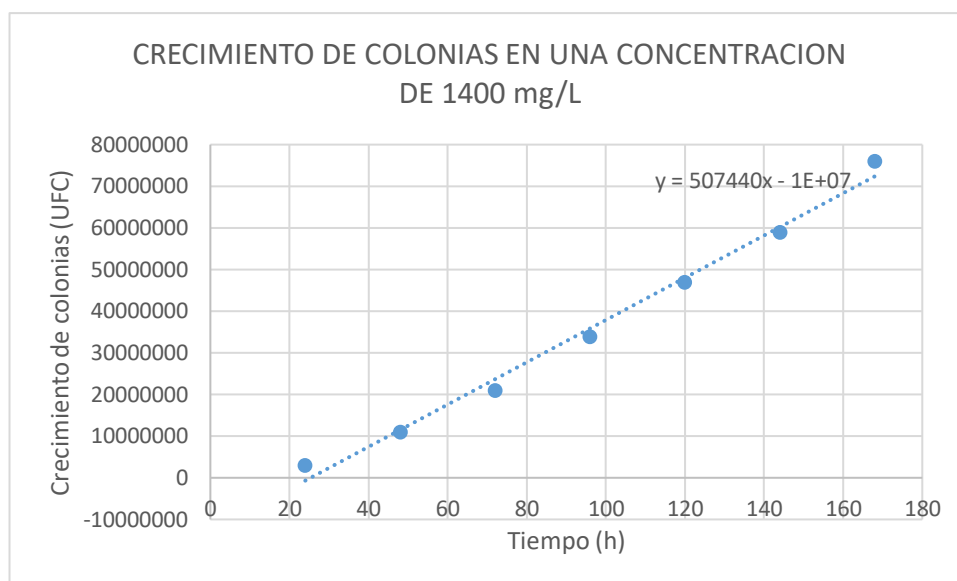


Figura 20. Crecimiento de colonias en concentración de 1400 mg/L.

En las figuras 14 a la 20, se muestra el crecimiento de colonias de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en concentraciones de 7, 35, 70, 350, 700, 1050 y 1400 mg/L en tiempos de 01 a 07 días (24 a 168 horas).

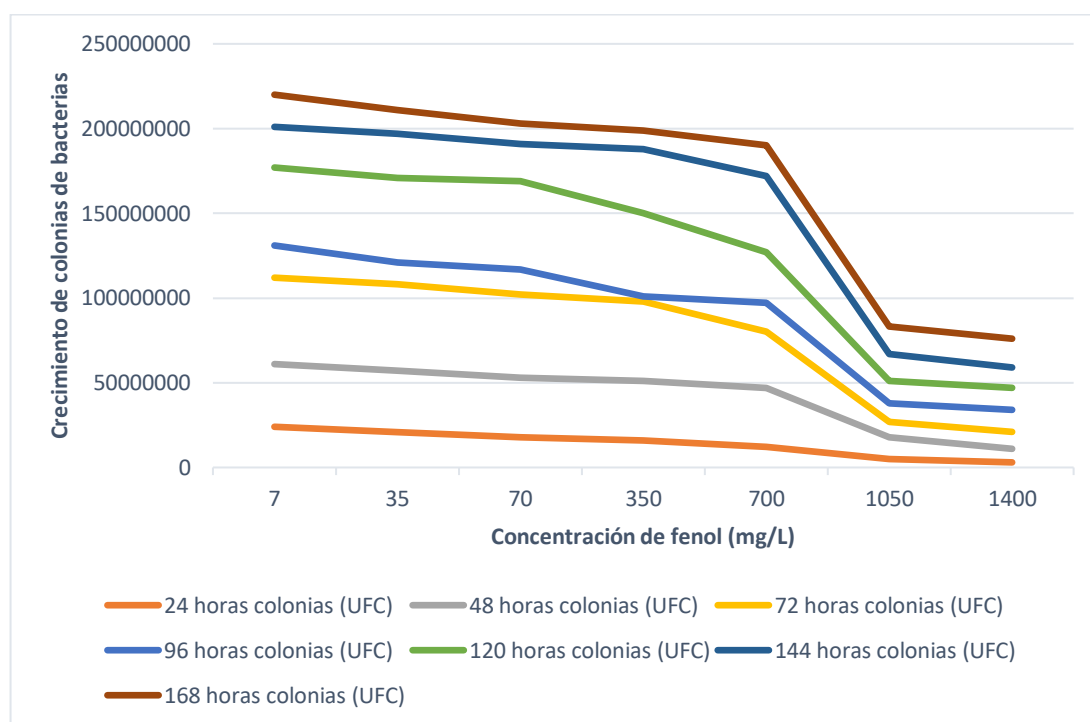


Figura 21. Crecimiento de colonias de bacterias en función de la concentración de fenol. De la Figura 21 podemos decir que, a menor concentración de fenol el crecimiento de bacterias es mayor, y a mayor concentración de fenol el crecimiento de bacterias es menor.

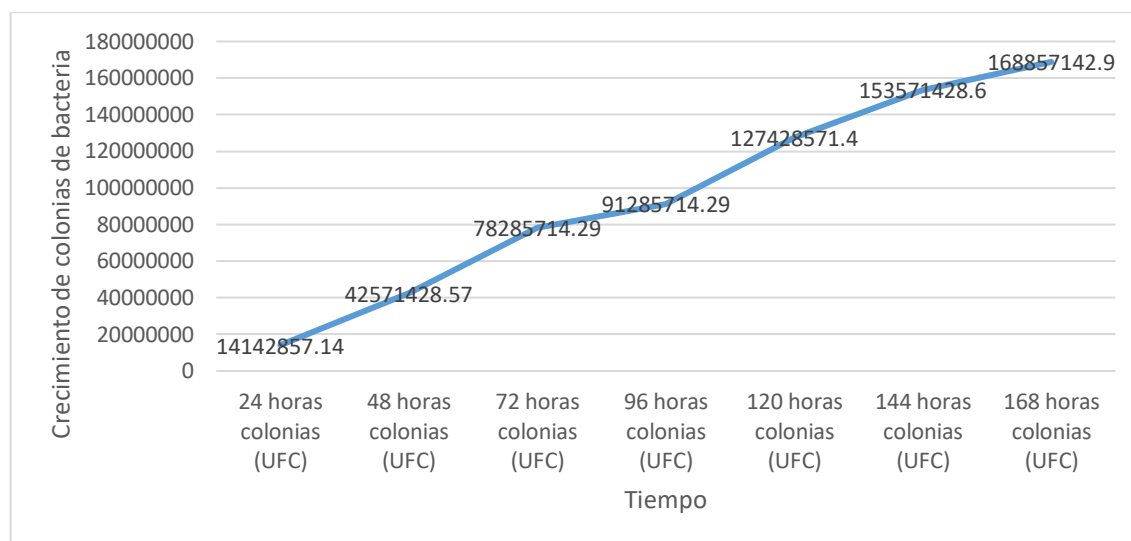


Figura 22. Crecimiento de colonias de bacterias en función del tiempo.

De la Figura 22 podemos decir que, a menor cantidad de horas el crecimiento de colonias es bajo.

Los resultados coinciden con lo que argumenta Prieto *et al.* (2002) el uso de bacterias puras para procesos de bioremediación y su adaptación a concentraciones de la sustancia a estudiar, como en el caso de fenol, y donde los procesos aeróbicos u oxigénicos son relevantes (Zhou *et al.*, 2011), así como la pre adaptación que aumenta eficiencia (Kwon & Yeom, 2009).

4.3 Degradación de fenol presente en aguas residuales provenientes de los baños químicos

Con el propósito de obtener resultados de la degradación del fenol presente en aguas residuales por medio de *Pseudomonas aeruginosa*, se desarrolló la parte experimental de la remoción del fenol, en un estanque de vidrio de 3.5 L de capacidad y en 4 matraces de 1000 ml, se aplicó células de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en matrices de alginato de calcio, se empleó 30.10 g. de geles de alginato de calcio equivalente a 310 perlas con diámetro de 0.3 cm, en muestras de 1 L con aireación constante de 220 - 240 V a temperatura ambiente con tiempos de contacto de 168 h para concentraciones iniciales de 368 mg/L de fenol (concentración alta) obteniendo como concentración final de 91.4 mg/L (porcentaje de remoción de 75.2%) y para las 3 muestras de 5 mg/L de fenol (concentración real), se empleó 10.03 g. de geles de alginato de calcio equivalente a 125

perlas con diámetro de 0.3 cm, en muestras de 1 L con aireación constante de 220 - 240 V a temperatura ambiente con tiempos de contacto de 96 h, obteniendo como concentración final 0.34; 0.18 y 0.21 mg/L (porcentaje de remoción de 93.2; 96.4; 95.8% respectivamente).

La reducción de la concentración de fenol utilizando *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada en geles de alginato de calcio coincide con lo que Mollaei *et al.* (2010) menciona en su trabajo, la inmovilización protege las células contra el fenol y resulta en una reducción notable (65%) en el tiempo de degradación por las células inmovilizadas en perlas de alginato (3%), en perlas híbridas de PVA-alginato o en cápsulas de ACA en comparación con las células suspendidas libremente. Las células inmovilizadas en PVA-alginato y ACA proporcionaron el mejor rendimiento en experimentos con concentraciones elevadas de fenol, hasta 2000 mg / L, con una degradación completa de 2000 mg / L de fenol después de 100 y 110 h, respectivamente.

Tabla 13

Concentración de fenol inicial (llevada al límite)

N° MUESTRA	TEMPERATURA (°C)	pH	NOMBRE DE MUESTRA LLEVADA AL LABORATORIO LAS	CONCENTRACIÓN DE FENOL ANTES DE UTILIZAR LA BACTERIA (mg/L)
1	15	7.0	M0	368.00

Tabla 14

Concentración de fenol final (llevada al límite) pasados 120 horas

TEMPERATURA (°C)	pH	N° PERLAS	NOMBRE DE MUESTRA LLEVADA AL LABORATORIO LAS	CONCENTRACIÓN DE FENOL DESPUES DE UTILIZAR LA BACTERIA (mg/L)
14	7.1	310	M1	91.4

Tabla 15

Concentración de fenol inicial

N° MUESTRA	TEMPERATURA (°C)	pH	NOMBRE DE MUESTRA LLEVADA AL LABORATORIO LAS	CONCENTRACIÓN DE FENOL ANTES DE UTILIZAR LA BACTERIA (mg/L)
1	15	7.5	MPO	5.00
2	14	7.1	MPO	5.00
3	15	6.8	MPO	5.00

Tabla 16

Concentración de fenol final pasados 72 horas

TEMPERATURA (°C)	pH	N° PERLAS	NOMBRE DE MUESTRA LLEVADA AL LABORATORIO LAS	CONCENTRACIÓN DE FENOL DESPUES DE UTILIZAR LA BACTERIA (mg/L)
14	4.9	125	MP1-1	0.34
15	5.2	125	MP1-2	0.18
15	5.1	125	MP1-3	0.21

Tabla 17

Degradación del fenol presente en aguas residuales de concentración inicial de 368 mg/L por medio de Pseudomonas aeruginosa inmovilizadas en matrices de geles de alginato de calcio.

N° MUESTRA	TEMPERATURA (°C)	pH	NOMBRE DE MUESTRA LLEVADA AL LABORATORIO LAS	CONCENTRACIÓN DE FENOL ANTES DE UTILIZAR LA BACTERIA (mg/L)	TIEMPO (HORAS)	TEMPERATURA (°C)	pH	N° PERLAS	NOMBRE DE MUESTRA LLEVADA AL LABORATORIO LAS	CONCENTRACIÓN DE FENOL DESPUES DE UTILIZAR LA BACTERIA (mg/L)	PORCENTAJE DE REMOCIÓN (%)
1	15	7.0	M0	368.00	120	14	7.1	310	M1	91.4	75.2

Tabla 18

Degradación del fenol presente en aguas residuales de concentración inicial de 5 mg/L por medio de Pseudomonas aeruginosa inmovilizadas en matrices de geles de alginato de calcio.

N° MUESTRA	TEMPERATURA (°C)	pH	NOMBRE DE MUESTRA LLEVADA AL LABORATORIO LAS	CONCENTRACIÓN DE FENOL ANTES DE UTILIZAR LA BACTERIA (mg/L)	TIEMPO (HORAS)	TEMPERATURA (°C)	pH	N° PERLAS	NOMBRE DE MUESTRA LLEVADA AL LABORATORIO LAS	CONCENTRACIÓN DE FENOL DESPUES DE UTILIZAR LA BACTERIA (mg/L)	PORCENTAJE DE REMOCIÓN (%)
1	15	7.5	MPO	5.00	72	14	4.9	125	MP1-1	0.34	93.2
2	14	7.1	MPO	5.00	72	15	5.2	125	MP1-2	0.18	96.4
3	15	6.8	MPO	5.00	72	15	5.1	125	MP1-3	0.21	95.8

Las tablas 17 y 18 muestran los resultados de la biodegradación de fenol presente en muestras de aguas residuales provenientes de los baños químicos con concentraciones iniciales de 368 y 5 mg/L de fenol por medio de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizados en geles de alginato de calcio, se obtuvieron concentraciones finales de 91.4, 0.34, 0.18 y 0.21 mg/L de fenol con remociones del 75.2, 93.2, 96.4 y 95.8 %, respectivamente.

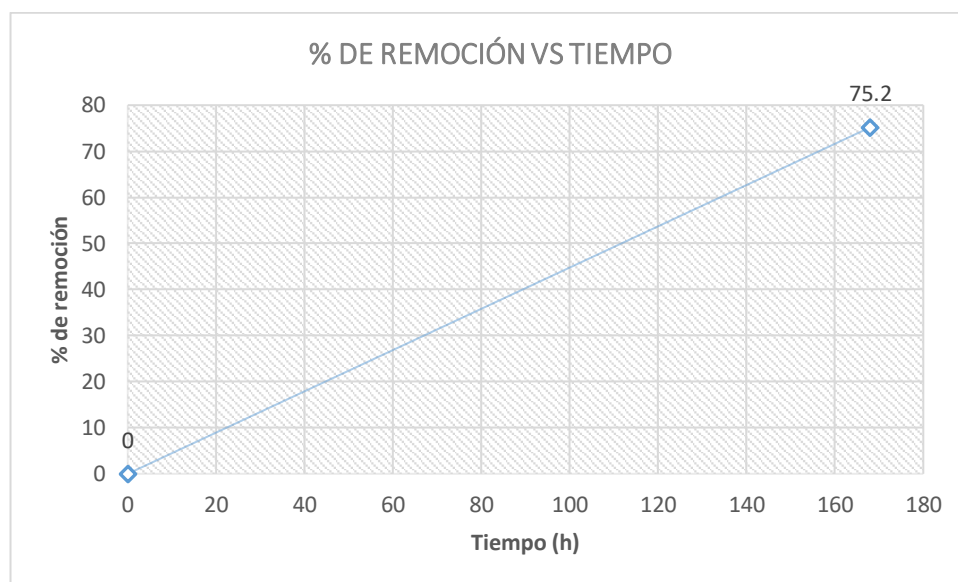


Figura 23. Porcentaje de remoción del fenol para una concentración de 368 mg/L (llevada al límite).

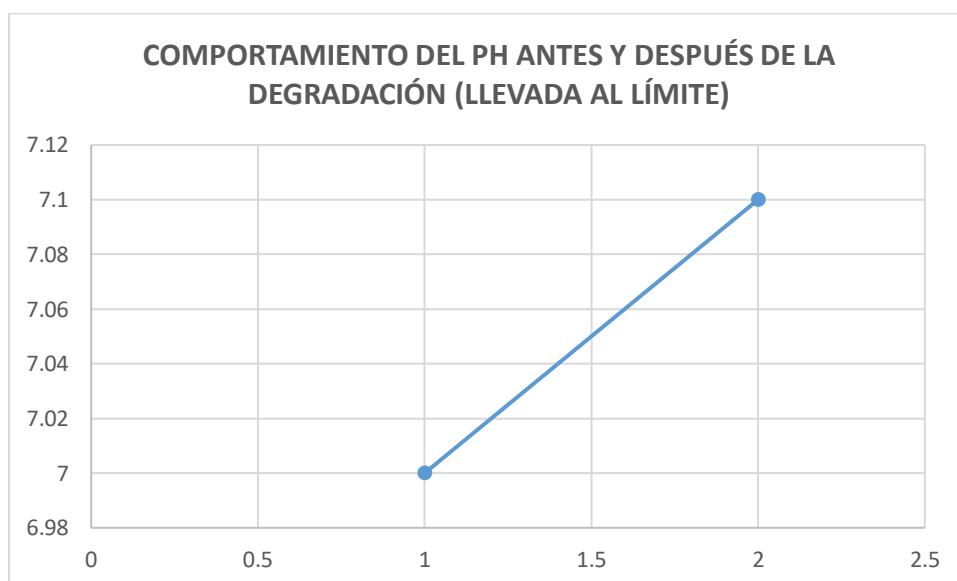


Figura 24. Comportamiento del pH antes y después de la degradación para una concentración de 368 mg/L (llevada al límite).

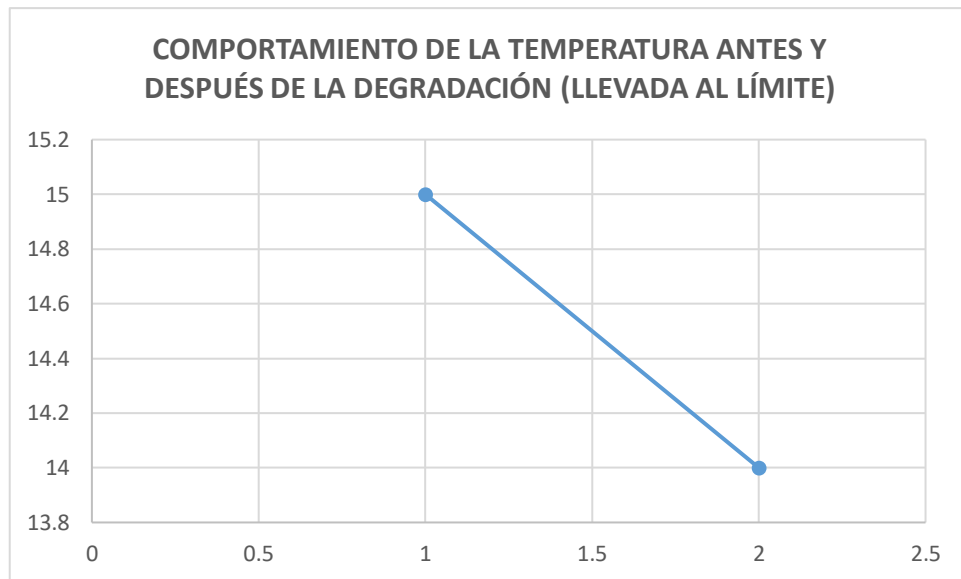


Figura 25. Comportamiento de la temperatura antes y después de la degradación para una concentración de 368 mg/L (llevada al límite).

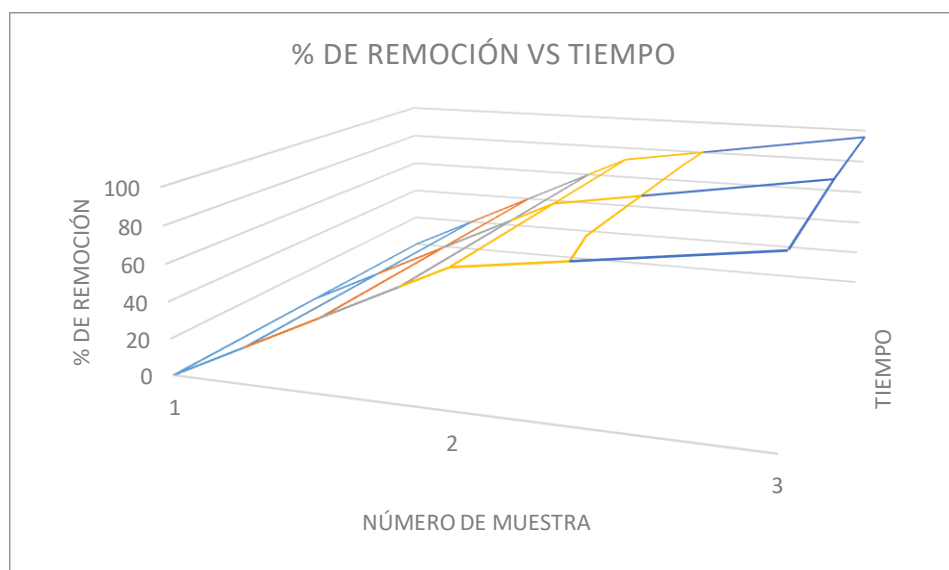


Figura 26. Porcentajes de remoción del fenol con el tiempo para una concentración de 5 mg/L.

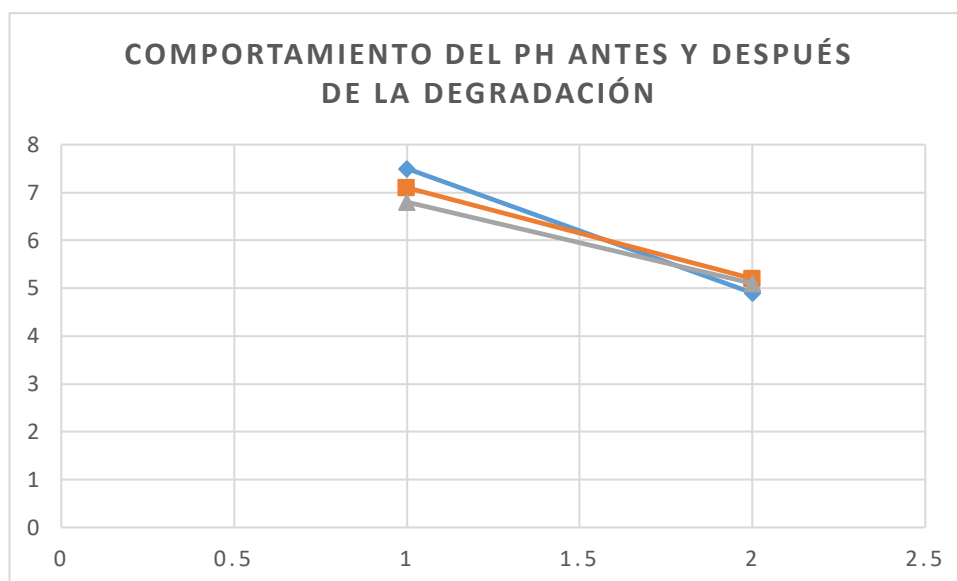


Figura 27. Comportamiento del pH antes y después de la degradación para una concentración de 5 mg/L.

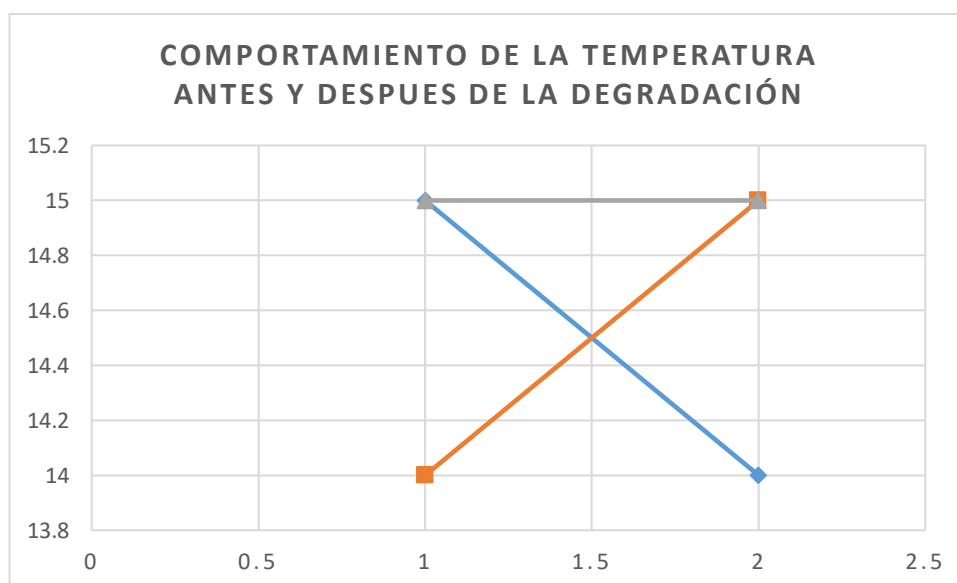


Figura 28. Comportamiento de la temperatura antes y después de la degradación para una concentración de 5 mg/L.

Las figuras 24 y 27 muestran el comportamiento del pH antes y después de la degradación para una concentración de 368 mg/L y 5 mg/L, se puede apreciar un ligero aumento del pH cuando la concentración de fenol es elevada, y cuando la concentración de fenol es reducida, existe una disminución del pH, lo que indica que, a un pH menor es mayor el porcentaje de remoción del fenol.

Las figuras 25 y 28 muestran el comportamiento de la temperatura antes y después de la degradación para una concentración de 368 mg/L y 5 mg/L, se puede apreciar un ligero aumento y disminución de la temperatura, lo cual indica que es un rango de temperatura correcto (entre 14 y 15 °C), que este influye en el porcentaje de remoción del fenol.

Las figuras 23 y 26 muestran que el porcentaje de remoción aumenta con el tiempo, en las primeras horas la remoción es lenta debido a que las células tienden a adaptarse para iniciar el proceso de degradación del fenol y otros compuestos presentes en las aguas residuales provenientes de los baños químicos, una vez ambientadas inician el proceso degradativo del fenol. Así pues, estos fenómenos son observados para las concentraciones de 368 y 5 mg/L de fenol, donde los periodos de adaptación son de 120 y 72 h, respectivamente, a las nuevas condiciones ambientales, en esta etapa la remoción es lenta y una vez adaptadas el porcentaje de remoción se incrementa gradualmente.

El análisis sobre la variable concentración inicial, de efecto negativo con el incremento de la misma, ha sido observado por Ghanem *et al.* (2013) afirmando que la concentración inicial del fenol influye en el proceso de degradación, por su parte Duan (2011) sostiene que a mayor concentración inicial la biomasa inmovilizada requiere mayor tiempo de contacto para la mineralización del fenol, asimismo Ullhyan & Ghosh (2012) plantearon que el incremento de la concentración inicial afecta el porcentaje de remoción, igualmente Agarry *et al.* (2014) proponen que la remoción del fenol decrece con el incremento de la concentración inicial, además Balamurugan *et al.* (2012) refiere que el efecto de la concentración inicial es inversamente proporcional con en el porcentaje de remoción, en conclusión la concentración inicial afecta la degradación del fenol Nor *et al.* (2013). Hecho que se coincide con los resultados obtenidos del presente estudio.

El análisis sobre el efecto positivo de matriz ha sido estudiado por Ullhyan & Ghosh (2012) afirmando que el incremento del inóculo libre o inmovilizado incrementa el porcentaje de remoción, por su parte Yordanova *et al.* (2013) plantea que las células aclimatadas e inmovilizadas reducen más rápido la concentración del fenol, en conclusión, la cantidad de inóculo libre o inmovilizado tiene efecto positivo en la degradación del fenol Leilei *et al.* (2012), lo citado concuerda con los porcentajes de remoción alcanzados, donde para la primera concentración (llevada al límite) se obtuvo un porcentaje de remoción del 75.2 % y para las demás concentraciones, porcentajes de remoción de 93.2; 96.4 y 95.8 %.

La temperatura ejerce una importante influencia reguladora sobre la tasa de metabolismo (Ghosh & Swaminathan, 2003). Los efectos del suministro de oxígeno varían de una especie a otra (Xu *et al.*, 2016). Además, la transferencia de masa de oxígeno se ve favorecida por las tasas de agitación que crean las turbulencias y las fuerzas de corte en el sistema de cultivo causan influencias significativas en la tasa de crecimiento y la formación del producto (Hoq & Deckwer, 1995), lo que concuerda con la investigación realizada, donde la temperatura se mantuvo en un rango entre 14 y 15 °C (temperatura ambiente) y con aireación constante de 220 - 240 V.

4.4 Modelo estadístico y significancia estadística de los parámetros de estudio

Tabla 19

Promedio y desviación estándar de la presencia de fenol antes y después del experimento

Presencia de fenol	Promedio	Desviación estándar
Antes	5.0000	0.0000
Después	0.2433	0.0850

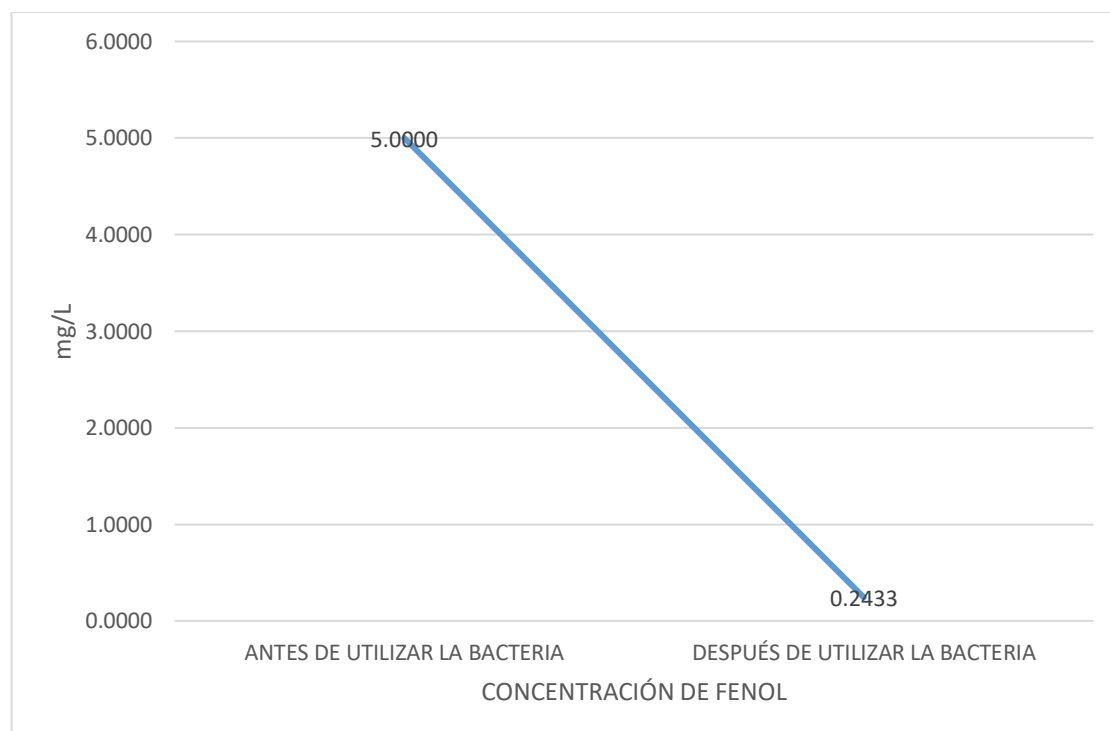


Figura 29. Promedio y desviación estándar de la presencia de fenol antes y después del experimento.

Tabla 20

Prueba de hipótesis unilateral de la diferencia pareada antes y después del efecto de la bacteria Pseudomonas aeruginosa en la capacidad degradativa frente al fenol

Diferencia	Media \bar{d}	Desviación estándar S_d	Grados de libertad	t	t_α
Antes-Después	4.75667	0.08505	2	96.871	4.303

Interpretación:

Como el valor de $t = 96.871$ es mayor a $t_\alpha = 4.303$ a un nivel de significancia del 5% se demuestra que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* tiene en la capacidad degradativa frente al fenol.

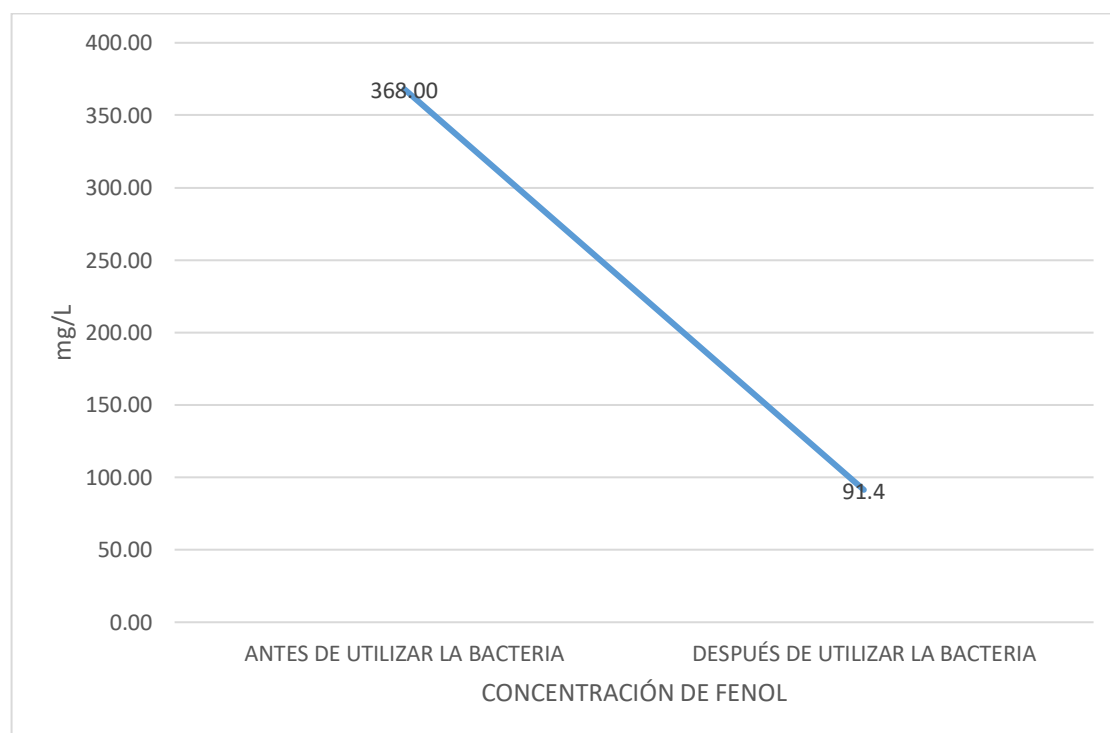


Figura 30. Prueba de hipótesis unilateral de la diferencia pareada antes y después del efecto de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en la capacidad degradativa frente al fenol.

4.5 Prueba de hipótesis de diferencia por parejas

El estudio se realizó para analizar la prueba de dos muestras, que estuvieron relacionados; es decir los resultados de la primera muestra no fueron independientes de la segunda muestra. Los resultados se obtuvieron de la investigación. Los datos se presentan en pares, donde no puede faltar el resultado de un par.

Para el cálculo, se trabajó con la diferencia entre los valores de las observaciones, es decir generamos una nueva columna de datos denominado d_i .

Tabla 21

Prueba de hipótesis de diferencia por parejas

Observación	Muestra 1	Muestra 2	Diferencia
1	X_{11}	X_{12}	d_1
2	X_{21}	X_{22}	d_2
⋮	⋮	⋮	⋮
I	X_{i1}	X_{i2}	d_i
⋮	⋮	⋮	⋮
N	X_{n1}	X_{n2}	d_n

Se lee:

X_{i1} : Es el i-ésimo valor de la muestra 1.

X_{i2} : Es el i-ésimo valor de la muestra 2.

D_i = Es la diferencia entre el i-ésimo valor de la muestra 1 y el i-ésimo valor de la muestra 2.

Luego:

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n}$$

$$S_d = \sqrt{n \sum_{i=1}^n d_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n d_i)^2}{n(n-1)}}$$

La diferencia promedio \bar{d} sigue una distribución normal cuando la desviación típica de la población de la diferencia es conocida.

El estadístico de prueba es $t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{S_d}$ con n-1 grados de libertad.



CONCLUSIONES

- Se logró el aislamiento primario en el medio de cultivo Agar Tripticosa Soya (TSA), se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas siendo consideradas muestras positivas las que no fueron contaminadas por mohos y hongos, para las 72 horas, el aislamiento secundario se realizó en agar MacConkey, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas. Se seleccionó las placas con mejores características morfológicas y se realizó un repique en agar Cetrimide, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas.
- La adaptación de bacterias se desarrolló de forma gradual con incrementos de dosificación de fenol químicamente puro en concentraciones de 7, 35, 70, 350, 700, 1050, y 1400 mg/L, en medio mineral de Fatherpure y Vogel (20%) con 10% de cultivo de cepas, en un periodo de 72 a 168 horas (3-7 días).
- Los resultados de la biodegradación de fenol, con concentraciones iniciales de 368 y 5 mg/L de fenol por medio de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizados en geles de alginato de calcio, se obtuvieron concentraciones finales de 91.4, 0.34, 0.18 y 0.21 mg/L de fenol con remociones del 75.2, 93.2, 96.4 y 95.8 %, respectivamente.

RECOMENDACIONES

- Se sugiere a las autoridades competentes implementen políticas de control en el vertimiento de aguas residuales contenidas de fenol y programas de capacitación de prevención para todos los involucrados.
- Optimizar el tiempo de degradación e investigar otras formas de encapsulamiento que participen en la biodegradación de muestras fenólicas.
- Continuar investigando a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados.
- Trabajar en la cinética de degradación de fenol, considerando otras variables para optimizar el proceso.
- Investigar el uso de otras bacterias y hongos que degraden el fenol de aguas residuales.
- Seguir investigando a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y su capacidad degradativa, en otras zonas del Perú.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Rodríguez, I., Moctezuma-Zárate, M. G., Tovar-Oviedo, J., & Cárdenas-González, J. F. (2011). Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras resistentes a petróleo. *Informacion Tecnologica*, 22(6), 103–110. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000600011>
- Agarry, S. E., Solomon, B. O., & Layokun, S. K. (2014). Optimization of process variables for the microbial degradation of phenol by *Pseudomonas aeruginosa* using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 7(14), 2409–2416. <https://doi.org/10.5897/AJB07.220>
- Aguirre Gómez, R. (2015). Análisis espectral del Lago de Guadalupe, mediante imágenes de satélite y datos in situ. *Investigaciones Geograficas*, 86(86), 15–24. <https://doi.org/10.14350/rig.42338>
- Al-Khalid, T., & El-Naas, M. H. (2012). Aerobic biodegradation of phenols: A comprehensive review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(16), 1631–1690. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.569872>
- ANA, A. nacional del agua. (2019). Protocolos de toma de muestra. Perú. Retrieved from <https://www.ana.gob.pe/>
- Annadurai, G., Juang, R. S., & Lee, D. J. (2002). Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas putida* and activated sludge. *Waste Management*, 22(7), 703–710. [https://doi.org/10.1016/S0956-053X\(02\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(02)00050-8)
- Annadurai, G., Ling, L. Y., & Lee, J. F. (2008). Adsorption of reactive dye from an aqueous solution by chitosan: isotherm, kinetic and thermodynamic analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 152(1), 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.002>
- APHA, AWWA, W. (2005). Métodos Normalizados para el Análisis de aguas potables y residuales. (“Standard Methods for the examination of water and wastewater”). Edición Díaz de Santos S.A. Madrid- España. Retrieved from http://imasd.fcien.edu.uy/difusion/educamb/docs/pdfs/manual_dinama.pdf
- Archundia, D., Duwig, C., Lehembre, F., Chiron, S., Morel, M. C., Prado, B., ... Martins, J. M. F. (2017). Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca Lake:

- Major transformation products and occurrence of resistance genes. *Science of the Total Environment*, 576, 671–682. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.129>
- Arenas, D. A. (2018). Aislamiento y Caracterización Molecular 16S rRNA de Cepas Bacterianas con Capacidad de Biodegradación de PEAD (Polietileno de Alta Densidad) Micro Contaminante en Aguas Sinteticas a Escala Laboratorio. *Tesis.Ucsm*. Retrieved from <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/8228>
- ATSDR. (2018). *Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades - Compuestos toxicos peligrosos*. EEUU. Retrieved from <https://www.atsdr.cdc.gov/es/index.html>
- Balamurugan, P.; Preetha, B.; Muthamilselvi, P.; and Viruthagiri, T. (2012). Application of statistical design for biodegradation of phenol using *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences: An International Peer, Review E-3 Journal of Science*, 3 (1), 727-735. Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Application+of+statistical+design+for+biodegradation+of+phenol+using+Aspergillus+fumigatus&btnG=
- Bandyopadhyay, D., Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J., & Kumar, R. (1998). Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA- dependent protein kinase in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(3), 1568–1573. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1568>
- Begum, M. A., Varalakshmi, B., & Umamageswari, K. (2015). Biodegradation of polythene bag using bacteria isolated from soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(11), 674–680. Retrieved from <http://www.ijcmas.com/vol-4-11/M.%0AAriba%0ABegum,%0Aet%0Aal.pdf>
- Bódalo, A., Gómez, J. L., Gómez, M., León, G., Hidalgo, A. M., & Ruíz, M. A. (2008). Phenol removal from water by hybrid processes: study of the membrane process step. *Desalination*, 223(1–3), 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.01.219>
- Bohórquez, D. N. B. (2014). *aeruginosa* aislada mediante selección , en consorcio con *Chlorella vulgaris* como matriz de inmovilización ., 1–14.
- Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C., & Arrighi, L. (2008). Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *Journal of*

- Hazardous Materials*, 160(2–3), 265–288.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.045>
- Bushnell, L. D., & Hass, H. F. (2017). The Utilization of Hydrocarbons by Microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 26(9), 636.
<https://doi.org/10.1271/bbb1961.26.636>
- Calabrese, E. J., & Kenyon, E. (2018). *Air toxics and risk assessment* (5th ed.). EEUU: CRC Press. Retrieved from [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=-jvvDgIht9QC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Calabrese+%26+Kenyon,+2014+-+Air+toxics+and+risk+assessment&ots=uUQ7wcoWE0&sig=tgjAyFkFy-PtfAaHc1stsTqSIDI#v=onepage&q=Calabrese %26 Kenyon%2C 2014 - Air toxics and risk assessment&f](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=-jvvDgIht9QC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Calabrese+%26+Kenyon,+2014+-+Air+toxics+and+risk+assessment&ots=uUQ7wcoWE0&sig=tgjAyFkFy-PtfAaHc1stsTqSIDI#v=onepage&q=Calabrese%26Kenyon%2C2014-Airtoxicsandriskassessment&f)
- Callata, C. R. (2014). DEGRADACIÓN DEL FENOL PRESENTE EN AGUAS RESIDUALES DE AERONAVES MEDIANTE *Pseudomonas aeruginosa*. *Universidad Nacional de Ingenierías*, 1–7.
- Camposano, C. B., Rangel-garcía, M. D. L., Garza-garcía, Y., Martínez-hernandez, J. L., Rodríguez-martínez, J., Carranza, B. V, & Valdez, C. (2018). DEGRADACIÓN DE FENOL POR CÉLULAS DE *Pseudomonas aeruginosa*. *Universidad Autónoma de Coahuila*, 2005.
- Cantillo, M. (2017). Optimización de consorcio alga-bacteria para degradación de fenol
Asesora :
- Chang, J. S., Chou, C., & Chen, S. Y. (2001). Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. *Process Biochemistry*, 36(8–9), 757–763.
[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00274-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00274-0)
- Collins, L. D., & Daugulis, A. J. (1999). Benzene/toluene/p-xylene degradation. Part I. Solvent selection and toluene degradation in a two-phase partitioning bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(3), 354–359.
<https://doi.org/10.1007/s002530051531>
- Duan, Z. (2011). MICROBIAL DEGRADATION OF PHENOL BY ACTIVATED SLUDGE IN A BATCH REACTOR. *Environment Protection Engineering*. Retrieved from https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34419212/Salinity_effect_on_

swelling_characteristics_of_compacted_bentonite.pdf?response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DSalinity_Effect_on_Swelling_Characterist.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256

- Echeverri Jaramillo, G. E. (2011). Adaptación de bacterias a diferentes concentraciones de fenol en el laboratorio: aspectos esenciales para un proceso de biodegradación. *Nova*, 9(15), 60. <https://doi.org/10.22490/24629448.489>
- El peruano, D. (2017). Aprueban Criterios para la Gestión de Sitios Contaminados D.S. 012-2017-MINAM. Retrieved from <https://elperuano.pe/>
- EPA Agency, U. S. E. P. (2014). *Quality Assurance Guidance Document-Model Quality Assurance Project Plan for the PM Ambient Air*. EEUU.
- Fathepure, B. Z., & Vogel, T. M. (2015). Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by a two-stage biofilm reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), 3418–3422. <https://doi.org/10.1128/aem.57.12.3418-3422.1991>
- Filloux, A., & Ramos, J. L. (2014). *Pseudomonas methods and protocols*. NJ: Humana Press. Retrieved from <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4939-0473-0>
- Forero, Ortiz & Rios, 2005. (2006). Influencia de l química superficial en la entapía de inmersión de carbones activados en soluciones acuosas de fenol y 4-nitro fenol. *Rev. Colomb. Quím. (Bogotá)*, 35(2), 21–24.
- Garcia, M. J. (2007). Optimización de la biodegradación de fenol en un reactor discontinuo secuencial. *Tecnología Del Agua*, 27(284), 70–76.
- Geng, A., Soh, A. E. W., Lim, C. J., & Loke, L. C. T. (2015). Isolation and characterization of a phenol-degrading bacterium from an industrial activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(5), 728–735. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0199-z>
- Ghanem, K. M., Al-Fassi, F. A., & Al-Hazmi, N. M. (2013). Optimization of chloroxylenol degradation by *Aspergillus niger* using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(1), 7983–7994. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1953>

- Ghosh, S., & Swaminathan, T. (2003). Optimization of process variables for the extractive fermentation of 2,3-butanediol by *Klebsiella oxytoca* in aqueous two-phase system using response surface methodology. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 17(4), 319–325.
- Google maps, G. (2019). Ubicación. Retrieved from <https://www.google.com/maps>
- Guevara, J. (2010). Efecto de la concentración de jabón doméstico a diferentes temperaturas sobre el desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* MBLAM-02 , aislada del río Moche (Perú) . *Universidad Nacional de Trujillo*.
- Gutierrez, J. G. (2013). Bioegradación de polietileno de baja densidad por consorcios microbianos, 58. Retrieved from https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis_gutierrez_pescador.pdf
- Hill, G. A., & Robinson, C. W. (1975). Substrate inhibition kinetics: Phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering*, 17(11), 1599–1615. <https://doi.org/10.1002/bit.260171105>
- Hoq, M. M., & Deckwer, W. D. (1995). Cellulase-free xylanase by thermophilic fungi: a comparison of xylanase production by two *Thermomyces lanuginosus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(4), 604–609. <https://doi.org/10.1007/BF00164761>
- Hussein, A. A., Al-Mayaly, I. K., Khudeir, S. H., Hussein, A. A. , Al-Mayaly, I. K., & Kudier, S. H. (2015). Mesopotamia Environmental Journal Isolation, Screening and Identification of Low Density Polyethylene (LDPE) degrading bacteria from contaminated soil with plastic wastes Isolation, Screening and Identification of Low Density Polyethylene (LDPE) degrading. *Mesopotomia Environment Journal*, 1(4), 1–14. Retrieved from www.bumej.com
- Jiang, Y., Wen, J., Bai, J., Jia, X., & Hu, Z. (2007). Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Hazardous Materials*, 147(1–2), 672–676. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.031>
- Koneman, E. W., & Allen, S. oneman, and S. A. (2008). *Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. (Ed. médica). Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=jyVQueKro88C&oi=fnd&pg=PA1&>

dq=Koneman+%26+Allen,+2008&ots=5PNg08aPoz&sig=sn9B8d113X2p81cGpK0ALPOMEV4#v=onepage&q=Koneman%26Allen%2C2008&f=false

- Kotturi, G., Robinson, C. W., & Inniss, W. E. (1991). Applied Microbiology Biotechnology Phenol degradation by a psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(4), 539–543.
- Kumar, A., Kumar, S., & Kumar, S. (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal*, 22(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.09.006>
- Kumari, S., Chetty, D., Ramdhani, N., & Bux, F. (2013). Phenol degrading ability of *Rhodococcus pyrinidivorans* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from activated sludge plants in South Africa. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 48(8), 947–953. <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.762740>
- Kwon, K. H., & Yeom, S. H. (2009). Optimal microbial adaptation routes for the rapid degradation of high concentration of phenol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(4), 435–442. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0263-z>
- LAS. (2019). Ensayos de laboratorio - deerminación de concentración de fenol. Arequipa, Perú: Laboratorios Analíticos del Sur. Retrieved from <http://www.laboratoriosanaliticosdelsur.com/>
- Leilei, Z., Mingxin, H., & Suiyi, Z. (2012). Biodegradation of p-nitrophenol by immobilized *Rhodococcus* sp. strain Y-1. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 26(2), 137–144.
- Masque, C. M. N. and A. B. (2016). SELECTION AND ADAPTATION OF A PHENOL-DEGRADING STRAIN OF PSEITDOMONAS. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- McBride, M. B. (2018). Toxic Metal Accumulation from Agricultural Use of Sludge: Are USEPA Regulations Protective? *Journal of Environmental Quality*, 24(1), 5–18. <https://doi.org/10.2134/jeq1995.00472425002400010002x>
- Melo, J. S., Kholi, S., Patwardhan, A. W., & D'Souza, S. F. (2005). Effect of oxygen

- transfer limitations in phenol biodegradation. *Process Biochemistry*, 40(2), 625–628. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.049>
- MINAM. (2019). *Estandares de calidad ambiental para agua*. Perú. Retrieved from <https://sinia.minam.gob.pe/normas/aprueban-estandares-calidad-ambiental-eca-agua-establecen-disposiciones>
- Mitra, D., van Leeuwen, J. (Hans), & Lamsal, B. (2012). Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, 1(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.03.002>
- Mollaie, M., Abdollahpour, S., Atashgahi, S., Abbasi, H., Masoomi, F., Rad, I., ... Noghabi, K. A. (2010). Enhanced phenol degradation by *Pseudomonas* sp. SA01: Gaining insight into the novel single and hybrid immobilizations. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1–3), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.002>
- Mujeriego, R. (2015). Riego con agua residual municipal regenerada. In *Tratamiento de aguas*. Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Rafael_Mujeriego/publication/230887765_Manual_Practico_De_Riego_Con_Agua_Residual_Municipal_Regenerada/links/5458b4f10cf2cf5164831668.pdf
- Naresh, B., Honey, P., & Vaishali, S. (2012). Biodegradation of Phenol by a Bacterial Strain Isolated From a Phenol Contaminated Site in India, 1(1), 46–49.
- Nor Suhaila, Y.; Rosfarizan, M.; Aqlima Ahmad, S.; Abdul Latif, I.; and Bin Ariff, A. (2013). Nutrients and culture conditions requirements for the degradation of phenol by *Rhodococcus* UKMP-5M. *Journal of Environmental Biology*, 34(3), 635–643.
- Oboirien, B. O., Amigun, B., Ojumu, T. V., Ogunkunle, O. A., Adetunji, O. A., Betiku, E., & Solomon, B. O. (2017). Parametros Para Varias De Degradacion Del Fenol Pseudomanos Improtnate.Pdf. Retrieved from <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/biotech/2005/56-61.pdf>
- Odokuma, L. O., & Okpokwasili, G. C. (1993). Seasonal ecology of hydrocarbon-utilizing microbes in the surface Waters of a river. *Environmental Monitoring and Assessment*, 27(3), 175–191. <https://doi.org/10.1007/BF00548364>

- OEFA. (2019). *Fiscalización ambiental en Aguas residuales. Lima - Perú: Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental - OEFA*. Retrieved from <https://www.gob.pe/oefa>
- Pardo-Díaz, S., Rojas-Tapias, D., Roldan, F., Brandão, P., & Almansa-Manrique, E. (2017). Biodegradación de fenol en aguas tratadas de la industria petrolera para re- uso en cultivos agrícolas. *Revista de Biología Tropical*, 65(2), 685–700. <https://doi.org/10.15517/rbt.v65i2.23992>
- Pérez, R., Camacho, M., Gomez, J., & Cantero, D. (2008). Aislamiento Y Seleccin De Una Cepa Bacteriana. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39(1), 9. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/1812/181214889004/>
- Peters, M., Heinaru, E., Talpsep, E., Wand, H., Stottmeister, U., Heinaru, A., & Nurk, A. (2017). Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, pheBA, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4899–4906. <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4899-4906.1997>
- Pixton, M. R., & Paul, D. R. (2016). Symmetry Effects. *Polymer*, 8277–8286.
- Pramila, R. (2012). *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas citronellolis* - Potential candidates for biodegradation of low density polyethylene (LDPE). *Journal of Bacteriology Research*, 4(1). <https://doi.org/10.5897/jbr12.003>
- Prieto, M. B., Hidalgo, A., Serra, J. L., & Llama, M. J. (2002). Degradation of phenol by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized on Biolite® in a packed-bed reactor. *Journal of Biotechnology*, 97(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00022-6)
- Prpich, G. P., & Daugulis, A. J. (2005). Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid-liquid two phase partitioning bioreactor. *Biodegradation*, 16(4), 329–339. <https://doi.org/10.1007/s10532-004-2036-y>
- Quan, X., Shi, H., Liu, H., Wang, J., & Qian, Y. (2004). Removal of 2,4-dichlorophenol in a conventional activated sludge system through bioaugmentation. *Process Biochemistry*, 39(11), 1701–1707. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00307-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00307-8)
- Quicaño Tafur, A. (2014). Reduccion De Compuestos Fenolicos En Aguas Residuales

- De Baños Portátiles Con Proceso De Oxidación Química Avanzada Ozono-Peroxido De Hidrogeno, (505). Retrieved from http://cybertesis.uni.edu.pe/bitstream/uni/1130/1/lopez_gj.pdf
- Quintana, R., & Valerio, L. (2016). Pseudomonas : Bacterias con potencial para degradar petróleo. *EcoCria*, 5(August), 3–5.
- Rangel-García, M. de L., Rodríguez-Martínez, J., Garza-García, Y., & Martínez-Hernández, J. L. (2010). Optimización de iones de hierro para la eliminación de piocianina en la reacción de degradación de tolueno, benceno y fenol por *Pseudomonas aeruginosa*. *Agrociencia*, 44(2), 235–247.
- Ren, J., Lin, W. T., Shen, Y. J., Wang, J. F., Luo, X. C., & Xie, M. Q. (2008). Optimization of fermentation media for nitrite oxidizing bacteria using sequential statistical design. *Bioresource Technology*, 99(17), 7923–7927. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.027>
- Resnik, K. P., Yeh, J. T., & Pennline, H. W. (2016). Kevin P, 4(x), 89–104.
- Rivera-Jacinto, M., Rodríguez-Ulloa, C., & Huayán-Dávila, G. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* productora de betalactamasa clásica y de espectro extendido en reservorios de un servicio de Neonatología. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*, 25(2), 250–252. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2008.252.1263>
- Rodríguez, M., Molina, J., Jacome, A., & Suarez, J. (2013). Humedal de flujo vertical para tratamiento terciario del efluente físico-químico de una estación depuradora de aguas residuales domésticas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 14(2), 223–235. [https://doi.org/10.1016/s1405-7743\(13\)72238-8](https://doi.org/10.1016/s1405-7743(13)72238-8)
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6)
- Ruiz-Ordaz, N., Ruiz-Lagunez, J. C., Castañón-González, J. H., Hernández-Manzano, E., Cristiani-Urbina, E., & Galíndez-Mayer, J. (2001). Phenol biodegradation using a repeated batch culture of *Candida tropicalis* in a multistage bubble column. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43(1), 19–25.
- Shetty, K. V., Kalifathulla, I., & Srinikethan, G. (2007). Performance of pulsed plate

- bioreactor for biodegradation of phenol. *Journal of Hazardous Materials*, 140(1–2), 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.09.058>
- Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, 29(6), 896–907. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.009>
- Tyman, J. H. (2017). *Synthetic and natural phenols*. (Elsevier). Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=WtEbOaX7WUEC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Tyman,+1996&ots=aDFemYB-9I&sig=z0vTQbO3Vc9UXIBxqF8AsG8PueA#v=onepage&q=Tyman%2C1996&f=false>
- Ullhyan, A., & Ghosh, U. K. (2012). Biodegradation of phenol with immobilized *Pseudomonas putida* activated carbon packed bio-filter tower. *African Journal of Biotechnology*, 11(85), 15160–15167. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3620>
- Valero, M. J. (2015). Estudio y desarrollo de materiales biocompatibles con aplicaciones biomédicas. Sistemas con diferentes morfologías basados en alginato. *Sciendirect*. Retrieved from <https://riunet.upv.es/handle/10251/47265>
- Vidya Shetty, K., Ramanjaneyulu, R., & Srinikethan, G. (2007). Biological phenol removal using immobilized cells in a pulsed plate bioreactor: Effect of dilution rate and influent phenol concentration. *Journal of Hazardous Materials*, 149(2), 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.024>
- Xu, R. X., Li, B., Zhang, Y., Si, L., Zhang, X. Q., & Xie, B. (2016). Response of biodegradation characteristics of unacclimated activated sludge to moderate pressure in a batch reactor. *Chemosphere*, 148, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.018>
- Yordanova, G., Godjevargova, T., Nenkova, R., & Ivanova, D. (2013). Biodegradation of phenol and phenolic derivatives by a mixture of immobilized cells of *Aspergillus awamori* and *Trichosporon cutaneum*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(2), 3681–3688. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2013.0003>
- Zhou, J., Yu, X., Ding, C., Wang, Z., Zhou, Q., Pao, H., & Cai, W. (2011). Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and

response surface methodology. *Journal of Environmental Sciences*, 23(1), 22–30.
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60369-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60369-5)

Zilli, M., Converti, A., Fava, F., & Nicolella, C. (2007). Control of 2-chlorophenol vapour emissions by a trickling biofilter. *Journal of Biotechnology*, 128(3), 654–658.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.12.014>

ANEXOS

Anexo 1. Certificación análisis de laboratorio



Laboratorios Analíticos del Sur
Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa - Perú

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582 www.laboratoriosanaliticosdel sur.com

INFORME DE ENSAYO LAS01-AG-19-00092
Fecha de emisión : 28/11/2019 Página 1 de 3

Señores : LUIS ALBERTO SUPO QUISPE
Dirección : JR AREQUIPA 984 PUNO
Atención : LUIS ALBERTO SUPO QUISPE
Proyecto : PROYECTO DE INVESTIGACION DE DETERMINACION DE FENOL EN AGUA RESIDUALES

PROTOCOLO DE MUESTREO

Muestreo realizado por : Cliente : LUIS ALBERTO SUPO QUISPE Fecha de recepción : 25/11/2019
Registro de muestreo : 438-19 Fecha de ensayo : 25/11/2019
Procedimiento Aplicado : Muestreado por el cliente Nro de muestras : 1

Cod. Interno L.A.S.	(c) Nombre de muestra	(c) Matriz de la muestra	(c) Zona, Urb, AAHH/Dist/Prov/Depart.	(c) Punto de muestreo y/o coordenadas	(c) Fecha de inicio de muestreo	(c) Hora de inicio de muestreo
AG19001128	MO	Agua Residual - Agua Residual Industrial	CARACOTO - SAN ROMAN - PUNO	IF	25/11/2019	16:00

(c) : datos proporcionados por el cliente. El laboratorio no se responsabiliza técnica ni legalmente por esta información.

Condiciones de recepción de la muestra
Cooler refrigerado
Observación
-


 Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
 Sixto Vicente Juárez Neira
 Gerente General
 Ing. Químico C.I.P. 19474



Laboratorios Analíticos del Sur
Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa - Perú

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582 www.laboratoriosanaliticosdel sur.com

INFORME DE ENSAYO LAS01-AG-19-00092
Fecha de emisión : 28/11/2019 Página 2 de 3

RESULTADOS DE ENSAYO FISICO QUIMICO

Código Interno L.A.S.	Nombre de Muestra	*865 Fenoles mg/L
AG19001128	MO	366


 Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
 Sixto Vicente Juárez Neira
 Gerente General
 Ing. Químico C.I.P. 19474



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa - Perú

Tel: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdel sur.com

INFORME DE ENSAYO LAS01-AG-19-00097

Fecha de emisión : 5/12/2019

Página 1 de 3

Sñores : LUIS ALBERTO SUPO QUISPE
Dirección : JR AREQUIPA 804 PUNO
Atención : LUIS ALBERTO SUPO QUISPE
Proyecto : PROYECTO DE INVESTIGACION - DETERMINACION DE FENOL

PROTOCOLO DE MUESTREO

Muestreo realizado por : Cliente : LUIS ALBERTO SUPO QUISPE
Registro de muestreo : 457-19
Procedimiento Aplicado : Muestreo por el cliente

Fecha de recepción : 2/12/2019
Fecha de ensayo : 2/12/2019
Nro de muestras : 2

Cod. Interno L.A.S.	(c) Nombre de muestra	(c) Matriz de la muestra	(c) Zona, Urb, AAHH/Dist/Prov/IDepart	(c) Punto de muestreo y/o coordenadas	(c) Fecha de inicio de muestreo	(c) Hora de inicio de muestreo
AG19001167	M1	Agua Residual - Agua Residual Industrial	CARACOTO - SAN ROMAN - PUNO	IF	1/12/2019	09:00
AG19001168	MP0	Agua Residual - Agua Residual Industrial	CARACOTO - SAN ROMAN - PUNO	IF	1/12/2019	09:00

(c) : datos proporcionados por el cliente. El laboratorio no se responsabiliza técnica ni legalmente por esta información.

Condiciones de recepción de la muestra
Al ambiente

Observación
-

Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Omar A. Juárez Soto
Gerente de Operaciones
Ingeniero Químico CIP 114426



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa - Perú

Tel: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdel sur.com

INFORME DE ENSAYO LAS01-AG-19-00097

Fecha de emisión : 5/12/2019

Página 2 de 3

RESULTADOS DE ENSAYO FISICO QUIMICO

Código Interno L.A.S.	Nombre de Muestra	*885 Fenoles mg/L
AG19001167	M1	91,4
AG19001168	MP0	5,00

Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Omar A. Juárez Soto
Gerente de Operaciones
Ingeniero Químico CIP 114426



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa - Perú

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdel sur.com

INFORME DE ENSAYO LAS01-AG-19-00099

Fecha de emisión : 13/12/2019

Página 1 de 3

Señores : LUIS ALBERTO SUPO QUISPE
Dirección : JR AREQUIPA 984 PUNO
Atención : LUIS ALBERTO SUPO QUISPE
Proyecto : -

PROTOCOLO DE MUESTREO

Muestreo realizado por : Cliente : LUIS ALBERTO SUPO QUISPE
Registro de muestreo : 489-19
Procedimiento Aplicado : Muestreo por el cliente

Fecha de recepción : 8/12/2019
Fecha de ensayo : 8/12/2019
Nro de muestras : 3

Cod. Interno L.A.S.	(c) Nombre de muestra	(c) Matriz de la muestra	(c) Zona, Urb, AAHH/Dist/Prov/Depart.	(c) Punto de muestreo y/o coordenadas	(c) Fecha de inicio de muestreo	(c) Hora de inicio de muestreo
AG19001202	MP1-1	Agua Residual - Agua Residual Industrial	CARACOTO - SAN ROMAN - JULIACA - PUNO	1F	8/12/2019	9:00
AG19001203	MP1-2	Agua Residual - Agua Residual Industrial	CARACOTO - SAN ROMAN - JULIACA - PUNO	1F	8/12/2019	9:05
AG19001204	MP1-3	Agua Residual - Agua Residual Industrial	CARACOTO - SAN ROMAN - JULIACA - PUNO	1F	8/12/2019	9:10

(c) : datos proporcionados por el cliente. El laboratorio no se responsabiliza técnica ni legalmente por esta información.

Condiciones de recepción de la muestra

Ai ambiente

Observación

-

Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Srta. Vicenta Juárez Neira
Gerente General
Ing. Químico C.I.P. 19474



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa - Perú

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdel sur.com

INFORME DE ENSAYO LAS01-AG-19-00099

Fecha de emisión : 13/12/2019

Página 2 de 3

RESULTADOS DE ENSAYO FISICO QUIMICO

Código Interno L.A.S.	Nombre de Muestra	*865 Fencloz mg/L
AG19001202	MP1-1	0,34
AG19001203	MP1-2	0,18
AG19001204	MP1-3	0,21

Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Srta. Vicenta Juárez Neira
Gerente General
Ing. Químico C.I.P. 19474

Anexo 3. Normatividad nacional

Reducir (Ctrl+1)

10	NORMAS LEGALES Miércoles 7 de junio de 2017 / El Peruano
<p>Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen Disposiciones Complementarias</p> <p style="text-align: center;">DECRETO SUPREMO N° 004-2017-MINAM</p> <p style="text-align: center;">EL PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA</p> <p>CONSIDERANDO:</p> <p>Que, el numeral 22 del artículo 2 de la Constitución Política del Perú establece que toda persona tiene derecho a gozar de un ambiente equilibrado y adecuado al desarrollo de su vida;</p> <p>Que, de acuerdo a lo establecido en el artículo 3 de la Ley N° 28611, Ley General del Ambiente, en adelante la Ley, el Estado, a través de sus entidades y órganos correspondientes, diseña y aplica, entre otros, las normas que sean necesarias para garantizar el efectivo ejercicio de los derechos y el cumplimiento de las obligaciones y responsabilidades contenidas en la Ley;</p> <p>Que, el numeral 31.1 del artículo 31 de la Ley, define al Estándar de Calidad Ambiental (ECA) como la medida que establece el nivel de concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, presentes en el aire, agua o suelo, en su condición de cuerpo receptor, que no representa riesgo significativo para la salud de las personas ni al ambiente; asimismo, el numeral 31.2 del artículo 31 de la Ley establece que el ECA es obligatorio en el diseño de las normas legales y las políticas públicas, así como un referente obligatorio en el diseño y aplicación de todos los instrumentos de gestión ambiental;</p> <p>Que, de acuerdo con lo establecido en el numeral 33.1 del artículo 33 de la Ley, la Autoridad Ambiental Nacional dirige el proceso de elaboración y revisión de ECA y Límites Máximos Permisibles (LMP) y, en coordinación con los sectores correspondientes, elabora o encarga las propuestas de ECA y LMP, los que serán remitidos a la Presidencia del Consejo de Ministros para su aprobación mediante Decreto Supremo;</p> <p>Que, en virtud a lo dispuesto por el numeral 33.4 del artículo 33 de la Ley, en el proceso de revisión de los parámetros de contaminación ambiental, con la finalidad de determinar nuevos niveles de calidad, se aplica el principio de gradualidad, permitiendo ajustes progresivos a dichos niveles para las actividades en curso;</p> <p>Que, de conformidad con lo establecido en el literal d) del artículo 7 del Decreto Legislativo N° 1013, Ley de Creación, Organización, y Funciones del Ministerio del Ambiente, este ministerio tiene como función específica elaborar los ECA y LMP, los cuales deberán contar con la opinión del sector correspondiente y ser aprobados mediante Decreto Supremo;</p> <p>Que, mediante Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM se aprueban los ECA para Agua y a través del Decreto</p>	<p>publicación de Proyectos Normativos y difusión de Normas Legales de Carácter General, aprobado por Decreto Supremo N° 001-2009-JUS; en virtud de la cual se recibieron aportes y comentarios al mismo;</p> <p>De conformidad con lo dispuesto en el numeral 8 del artículo 118 de la Constitución Política del Perú, así como el numeral 3 del artículo 11 de la Ley N° 29158, Ley Orgánica del Poder Ejecutivo;</p> <p style="text-align: center;">DECRETA:</p> <p>Artículo 1.- Objeto de la norma La presente norma tiene por objeto compilar las disposiciones aprobadas mediante el Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM, el Decreto Supremo N° 023-2009-MINAM y el Decreto Supremo N° 015-2015-MINAM, que aprueban los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua, quedando sujetos a lo establecido en el presente Decreto Supremo y el Anexo que forma parte integrante del mismo. Esta compilación normativa modifica y elimina algunos valores, parámetros, categorías y subcategorías de los ECA, y mantiene otros, que fueron aprobados por los referidos decretos supremos.</p> <p>Artículo 2.- Aprobación de los Estándares de Calidad Ambiental para Agua Apruébase los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua, que como Anexo forman parte integrante del presente Decreto Supremo.</p> <p>Artículo 3.- Categorías de los Estándares de Calidad Ambiental para Agua Para la aplicación de los ECA para Agua se debe considerar las siguientes precisiones sobre sus categorías:</p> <p>3.1 Categoría 1: Poblacional y recreacional</p> <p>a) Subcategoría A: Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable Entiéndase como aquellas aguas que, previo tratamiento, son destinadas para el abastecimiento de agua para consumo humano:</p> <ul style="list-style-type: none"> - A1. Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección Entiéndase como aquellas aguas que, por sus características de calidad, reúnen las condiciones para ser destinadas al abastecimiento de agua para consumo humano con simple desinfección, de conformidad con la normativa vigente. - A2. Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional Entiéndase como aquellas aguas destinadas al abastecimiento de agua para consumo humano, sometidas a un tratamiento convencional, mediante dos o más de los siguientes procesos: Coagulación, floculación,

Categoría 4: Conservación del ambiente acuático

Parámetros	Unidad de medida	E1: Lagunas y lagos	E2: Ríos		E3: Ecosistemas costeros y marinos	
			Costa y sierra	Selva	Estuarios	Marinos
FÍSICOS-QUÍMICOS						
Aceites y Grasas (MEH)	mg/L	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Cianuro Libre	mg/L	0,0052	0,0052	0,0052	0,001	0,001
Color (b)	Color verdadero Escala Pt/Co	20 (a)	20 (a)	20 (a)	**	**
Clorofila A	mg/L	0,008	**	**	**	**
Conductividad	(μ S/cm)	1 000	1 000	1 000	**	**
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	mg/L	5	10	10	15	10
Fenoles	mg/L	2,56	2,56	2,56	5,8	5,8
Fósforo total	mg/L	0,035	0,05	0,05	0,124	0,062
Nitratos (NO ₃) (c)	mg/L	13	13	13	200	200
Amoniaco Total (NH ₄)	mg/L	(1)	(1)	(1)	(2)	(2)
Nitrógeno Total	mg/L	0,315	**	**	**	**
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	\geq 5	\geq 5	\geq 5	\geq 4	\geq 4
Potencial de Hidrógeno (pH)	Unidad de pH	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,8 – 8,5	6,8 – 8,5
Sólidos Suspendidos Totales	mg/L	\leq 25	\leq 100	\leq 400	\leq 100	\leq 30
Sulfuros	mg/L	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Temperatura	$^{\circ}$ C	Δ 3	Δ 3	Δ 3	Δ 2	Δ 2
INORGÁNICOS						
Antimonio	mg/L	0,64	0,64	0,64	**	**
Arsénico	mg/L	0,15	0,15	0,15	0,036	0,036
Bario	mg/L	0,7	0,7	1	1	**
Cadmio Disuelto	mg/L	0,00025	0,00025	0,00025	0,0088	0,0088
Cobre	mg/L	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05
Cromo VI	mg/L	0,011	0,011	0,011	0,05	0,05
Mercurio	mg/L	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Niquel	mg/L	0,052	0,052	0,052	0,0082	0,0082
Plomo	mg/L	0,0025	0,0025	0,0025	0,0081	0,0081

Anexo 4. Panel fotográfico



Figura 31. Pesado de agares para aislamiento y acondicionamiento de bacterias.



Figura 32. Preparación de medios de cultivo.



Figura 33. Aislamiento de bacterias.



Figura 34. Preparación de medios de cultivo



Figura 35. Repique de bacterias



Figura 36. Siembra de bacterias



Figura 37. Baño químico portátil



Figura 38. Adaptación de baterías a altas concentraciones



Figura 39. Preparación de medios para encapsulamiento



Figura 40. Cabina de flujo de laminar para encapsulamiento



Figura 41. Coloración Gram



Figura 42. Coloración Gram

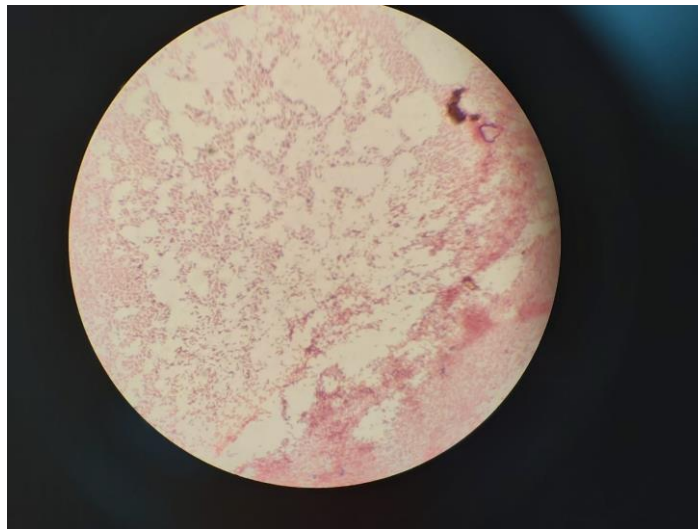


Figura 43. Bacterias coloreadas con tinción Gram

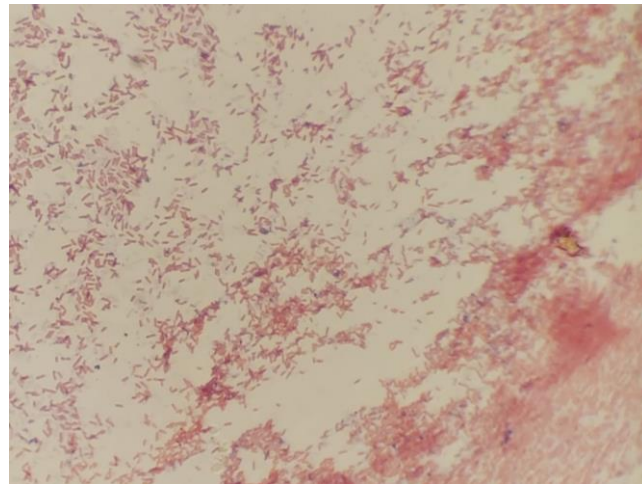


Figura 44. Bacterias coloreadas con tinción Gram



Figura 45. Aislamiento de bacteria *Pseudomonas aeruginosa*



Figura 46. Fenol químicamente puro

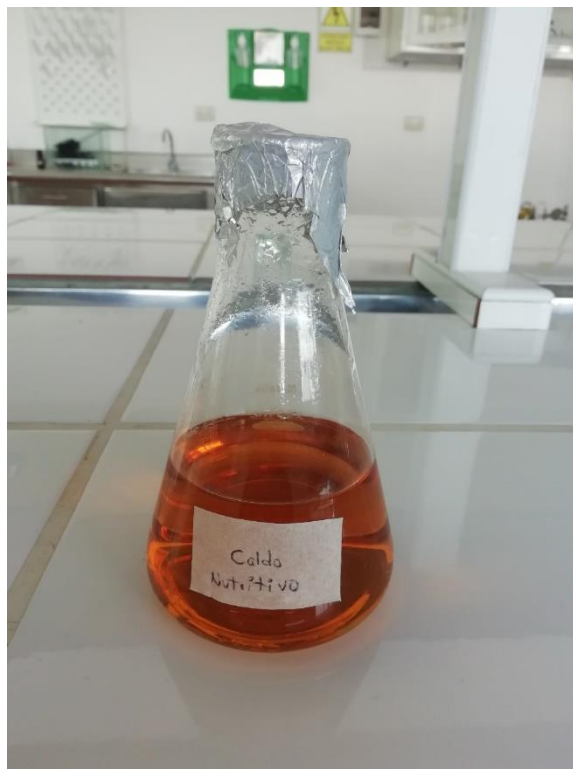


Figura 47. Caldo nutritivo



Figura 48. Perlas de alginato de calcio



Figura 49. Encapsulamiento en perlas de alginato de calcio

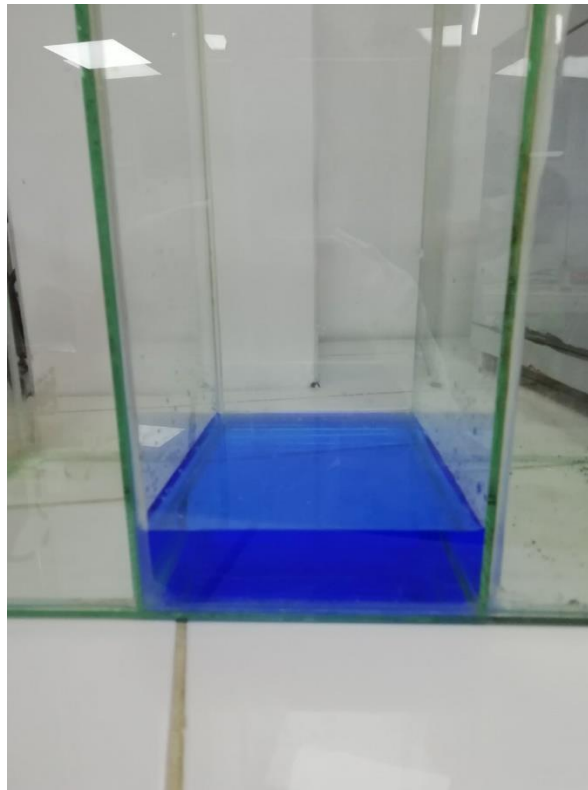


Figura 50. Fenol a alta concentración

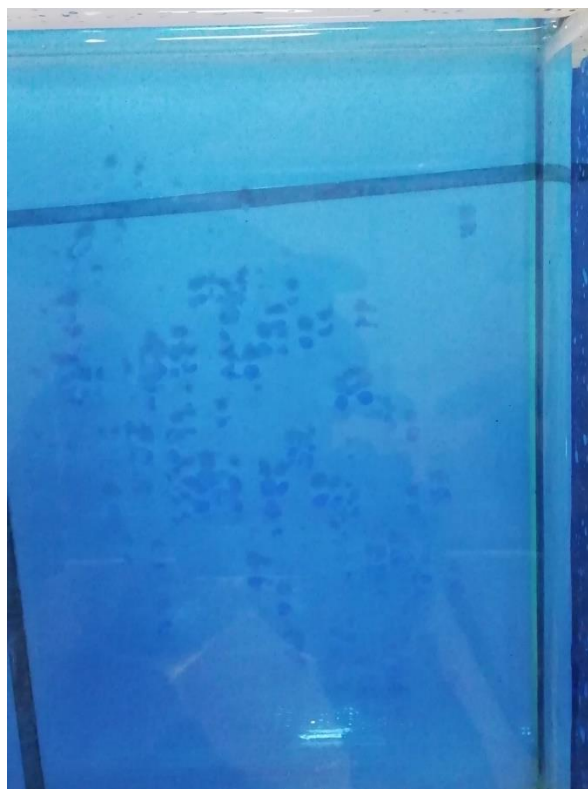


Figura 51. Degradación de fenol con perlas de alginato de calcio

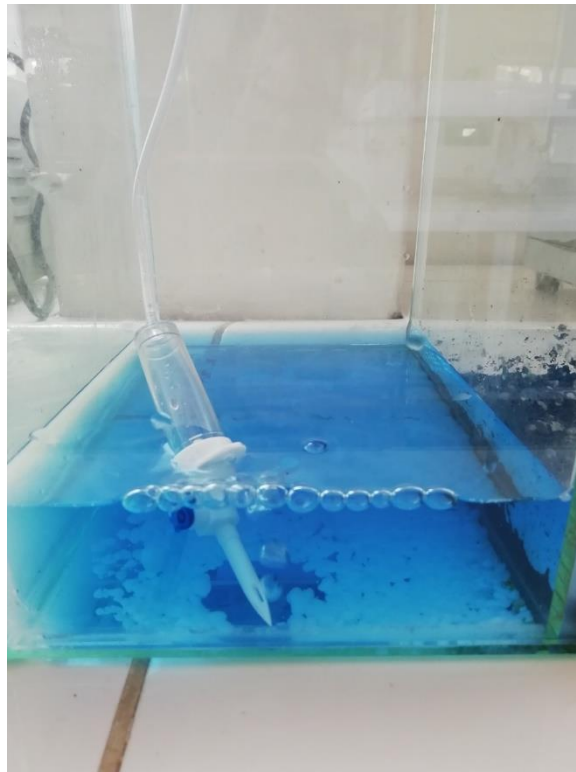


Figura 52. Aireación constante



Figura 53. Muestras de aguas residuales



Figura 54. Muestras con acción de perlas de alginato de calcio