

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
DEPARTAMENTO ACADEMICO DE CIENCIAS EN CONSERVACIÓN DE
SUELOS Y AGUA



Biodegradación de Al^{+3} y Fe^{+3} mediado por bacterias aisladas de zona tropical.

TESIS

Para optar el título de:

INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES
MENCIÓN CONSERVACIÓN DE SUELOS Y AGUA

Presentado por:

Alarcón Pérez Gabriela

Tingo María – Perú 2010



T01
A33

Alarcón Pérez, Gabriela.

Biodegradación de Al^{+3} y Fe^{+3} Mediado por Bacterias Aisladas de Zona Tropical.
Tingo María, 2010

50 h.; 13 cuadros; 6 fgrs.; 51 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Recursos Naturales Renovables Mención: Conservación de Suelos y Agua) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Recursos Naturales Renovables.

1. BIODEGRADACION 2. CONTAMINACION AMBIENTAL 3. AISLAMIENTO -
BACTERIAS 4. BIORREMEDIACION 5. POLUCION 6. TINGO MARIA 7. PERU.

DEDICATORIA

A mis queridos padres: **NARCISO** y **ANA LUISA**, con infinito amor y gratitud, por su apoyo indismayable en el logro de mis objetivos y por enseñarme a luchar cada día y no desmayar ante los obstáculos de la vida los amo con todas las fuerzas de mí ser.

A mis queridos hermanos: **BENAZIR ANA LUZMILA** y **JOSÉ LUIS** a quienes agradezco su apoyo moral y su gran cariño juntos compartimos los mejores momentos de mi vida.

A mí querida tía: **ISOLINA** por sus consejos y su gran apoyo en todo momento.

A mis queridos abuelitos **ALICIA RENGIFO, IDELSO PÉREZ, LUZMILA TERRONES** y **OCTAVIO ALARCÓN** por sus sabios consejos.

AGRADECIMIENTO

A DIOS por guiar mi camino, por todas y cada una de las bendiciones que me ha dado.

De una manera muy especial a mi asesor Dr. César López López por su apoyo, confianza, por sus sabios consejos, aportes en el desarrollo y redacción de esta tesis.

Al Ingeniero Richar Sías por su gran apoyo en la ejecución de la presente investigación.

A la Señora Glelia Ríos por el apoyo brindado en los análisis en espectrofotómetro de absorción atómica.

A mi Amado, Marcelo Díaz Ríos por su cariño, comprensión, apoyo incondicional en todo momento de mi carrera profesional.

A mis queridos amigos, Viviana Ruiz, Carolina Silva, Brendy Chanta, Jenny León, Jenny Huamán, Fiorela Güere, Karina Rivera, Carolina Reyna, Lucy Saavedra, Jeanet Pisco, Nely Aranda y Frank Araujo que de una u otra manera han colaborado en la ejecución de la presente investigación, con quienes compartí experiencias gratas en las aulas de nuestra Universidad y por estar conmigo en los momentos más difíciles de mi vida universitaria.

ÍNDICE

	Páginas
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Contaminación.....	3
2.2. Contaminación de suelos, agua y aire.....	3
2.2.1. Principales contaminantes del suelo.....	4
2.2.2. Principales contaminantes del agua.....	4
2.2.3. Principales contaminantes del aire.....	4
2.3. Contaminantes por metales tóxicos.....	5
2.3.1. Contaminación por aluminio.....	6
2.3.2. Contaminación por hierro.....	7
2.4. Contaminación en el sector La Muyuna.....	8
2.5. Acción de los microorganismos sobre la contaminación por metales.....	9
2.6. Biorremediación.....	12
2.7. Factores ambientales.....	13
2.7.1. Oxígeno.....	13
2.7.2. pH.....	14
2.7.3. Temperatura.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1 Lugar de ejecución.....	16

3.2. Unidades de estudio.....	16
3.2.1. Biológicas.....	16
3.2.2. Químicas.....	16
3.3. Metodología de estudio.....	16
3.3.1. Recolección de muestras.....	16
3.3.2. Aislamiento de bacterias.....	17
3.3.3. Etapa de adaptación.....	17
3.3.4. Bacterias en consorcio.....	18
3.3.5. Etapa de Operación en biorreactores.....	18
3.3.6. Datos registrados.....	19
3.3.6.1. Oxígeno disuelto.....	19
3.3.6.2. Dióxido de carbono.....	19
3.3.6.3. Temperatura.....	20
3.4.6.4. Determinación del pH.....	20
3.3.6.5. Densidad celular en consorcio.....	20
3.3.6.6. Concentración del químico.....	21
3.4. Diseño experimental.....	21
3.5. Ajuste estadístico.....	22
IV. RESULTADOS.....	23
4.1. Bacterias en consorcio.....	23
4.2. Biodegradación de aluminio y hierro.....	23
4.3. Densidad celular (DC) y producción de CO ₂	25
4.4. Determinación de oxígeno disuelto.....	27
4.5. Temperatura.....	29

4.6. Determinación del pH.....	29
4.7. Ajuste estadístico.....	31
4.7.1. Biodegradación de aluminio.....	31
4.7.2. Biodegradación de hierro.....	32
V. DISCUSIÓN.....	34
VI. CONCLUSIONES.....	40
VII. RECOMENDACIONES.....	41
VIII. ABSTRACT.....	42
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
X. ANEXO.....	50

ÍNDICE DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 1. Bacterias en consorcio.....	24
Cuadro 2. Concentraciones de aluminio y hierro presentes en los biorreactores a los 8 y 15 días de iniciada la operación.....	25
Cuadro 3. Porcentaje de la degradación de aluminio y hierro mediada por bacterias en consorcio.....	26
Cuadro 4. Densidad celular y producción de CO ₂ de bacterias en consorcio en presencia de aluminio.....	27
Cuadro 5. Densidad celular y producción CO ₂ de bacterias en consorcio en presencia de hierro.....	28
Cuadro 6. Concentración de oxígeno disuelto en los biorreactores con bacterias en consorcio en presencia de aluminio.....	29
Cuadro 7. Concentración de oxígeno disuelto en los biorreactores con bacterias en consorcio en presencia de hierro.....	29
Cuadro 8. Temperatura externa e interna durante la operación en biorreactores air lift con bacterias en consorcio en presencia de aluminio.....	30
Cuadro 9. Temperatura externa e interna durante la operación en biorreactores air lift con bacterias en consorcio en presencia de hierro.....	30
Cuadro 10. Determinación del pH en el desarrollo de bacterias en consorcio en presencia de aluminio.....	31

Cuadro 11. Determinación del pH en el desarrollo de bacterias en consorcio en presencia de hierro.....	31
Cuadro 12. Análisis de varianza para biodegradación de aluminio.....	32
Cuadro 13. Análisis de varianza para biodegradación de hierro.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Consumo de aluminio por bacterias en consorcio.....	25
Figura 2. Consumo de hierro por bacterias en consorcio.....	26
Figura 3. Adicionando glucosa a los reactores.....	52
Figura 4. Lecturas en espectrofotómetro de absorción atómica.....	53
Figura 5. Personas reciclando basura.....	53
Figura 6. Volquetes botando basura al sector La Muyuna.....	54

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad de bacterias autóctonas del sector la Muyuna de Tingo María para la degradación de metales como el Al^{+3} y Fe^{+3} presentes en suelos.

Se trabajó en biorreactores airlift a los que se le adicionó glucosa, extracto de levadura y un inóculo de bacterias en consorcio. El tiempo de operación fue de 15 días. Para monitorear la biodegradación se evaluó oxígeno disuelto, dióxido de carbono, temperatura, pH y densidad celular en consorcio.

Las lecturas de Al^{+3} y Fe^{+3} se realizaron en espectrofotómetro de absorción atómica, determinándose que para la Al^{+3} en el tratamiento 4 se obtuvo la mayor remoción (166.667 mg/L) seguido por el tratamiento 3 (107.333mg/L) mientras que el tratamiento 1(42.0mg/L) tuvo un menor valor hasta los quince días y para Fe^{+3} el tratamiento 3 fue el que presentó mayor remoción (10.266mg/L) y fue estadísticamente diferente a los demás, seguido del tratamiento 2 con consumo de 7.57mg/L siendo estadísticamente diferentes a los demás ,por tanto los tratamientos 4 y 1 (de 3.06mg/L y 3mg/L) respectivamente no tuvieron diferencia estadística entre ellos ,siendo diferentes con respecto a los tratamientos 3 y 2.

I. INTRODUCCIÓN

Los metales tienden a acumularse en la superficie del suelo quedando accesibles al consumo de las raíces de los cultivos (BAIRD, 1999). Los vegetales cultivados en suelos contaminados por exceso de metales los absorben y concentran en los tejidos, algunos de ellos son utilizados como oligoelementos, especialmente los que están en solución (KABATA-PENDIAS y PENDIAS, 2001). Así mismo, GULSON *et al.* (1996) mencionan, que excesivas concentraciones de metales en el suelo podrían impactar la seguridad del ambiente, producción de cultivos y la calidad de los alimentos, ya que estos se mueven a través de la cadena alimenticia vía consumo de vegetales por animales y estos a su vez por humanos.

La opción de utilizar bacterias y sus enzimas extracelulares, abre las posibilidades de aplicarlas en la transformación de compuestos químicos de alta complejidad o difíciles de degradar que están presentes en el suelo. (COSTERTON, 1981; LOPEZ, 1996).

Para la remoción y degradación de compuestos químicos se utilizan actualmente los biorreactores, los cuáles pueden ser construidos con materiales domésticos adecuándolos a las necesidades de la investigación proyectada. El rol que debe cumplir el reactor es de obtener el producto específico o la operación planeada (LOPEZ, 1996; MIRANDA *et al.*, 2001).

Los suelos del sector La Muyuna de Tingo María muestran evidencias de posible contaminación con metales potencialmente tóxicos, como hierro y aluminio, debido a los residuos sólidos que sobre ellos se arroja indiscriminadamente los cuales causan la contaminación del suelo y de las aguas que infiltran llegando hacia el río Huallaga, cuyas aguas son utilizadas río abajo por las poblaciones ubicadas a lo largo de sus riberas lo que ocasionaría en un período no muy lejano, debido a la distribución de esos potenciales contaminantes tóxicos, problemas de salubridad pública.

En tal sentido surge la interrogante: ¿Qué capacidad biodegradable mostrarán las bacterias aisladas del sector La Muyuna de Tingo María que median la transformación de metales como Al^{+3} y Fe^{+3} , presentes en suelos contaminados por residuos sólidos? contrastándose la hipótesis de que las bacterias aisladas de La Muyuna tienen la capacidad de biodegradar el Al^{+3} y Fe^{+3} . En tal sentido se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar la capacidad de bacterias autóctonas del sector La Muyuna de Tingo María para la degradación de metales como el Al^{+3} y Fe^{+3} presentes en suelos.
- Aislar microorganismos con capacidad de degradar Al^{+3} y Fe^{+3} .
- Determinar la capacidad de degradación bacteriana de Al^{+3} y Fe^{+3} en biorreactores tipo air lift.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Contaminación

Es un cambio perjudicial en las características físicas, químicas y biológicas de nuestro agua, aire y tierra, que puede afectar o afectará nocivamente la vida humana y la de especies beneficiosas. (ODUM ,1986)

Los problemas de contaminación surgen con la revolución industrial, donde de forma gradual se fueron generando diversos tipos de residuos. Al principio no se prestaba interés por la generación de residuos porque se confiaba en la capacidad del medio para asimilarlos y se desconocía además sus efectos devastadores. A partir de los años 60 se empezó a comprender el problema de los contaminantes ambientales (CASTILLO *et al.*, 2005).

2.2. Contaminación de suelos, agua y aire

La acumulación de desechos, sobre todo en áreas urbanas, genera la dispersión de gran diversidad de compuestos en suelos, aguas superficiales y aire, con la consecuente filtración de los mismos hacia las aguas subterráneas (VULLO, 2003).

2.2.1. Principales contaminantes del suelo

Los contaminantes del suelo se pueden dividir en dos grandes grupos: orgánicos e inorgánicos. Entre los contaminantes orgánicos se encuentran principalmente compuestos del grupo BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), fenoles, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y plaguicidas (OROZCO *et al.*, 2004). Entre los contaminantes inorgánicos destacan los metales tóxicos (SERRANO *et al.*, 2006).

2.2.2. Principales contaminantes del agua

El agua pura es un recurso natural renovable. Sin embargo, puede llegar a estar contaminada por las actividades humanas inutilizándola para muchos propósitos y ser nociva para los organismos vivos que la usan. La contaminación del agua es un problema local, regional y mundial relacionada con la contaminación del aire y con el modo en que usamos el recurso tierra (TYLER, 1994).

Entre los contaminantes de las aguas superficiales y subterráneas según su naturaleza se pueden presentar tóxicos químicos, alteraciones físicas y material biológico (HILL, 1997).

2.2.3. Principales contaminantes del aire

Respecto a contaminantes atmosféricos estos pueden contener residuos de hierro y aluminio formando partículas que constituyen aerosoles, ceniza y hasta sales.

Otros contaminantes atmosféricos pueden ser:

- Compuestos de azufre: SO_2 , SO_3 , SH_2 , mercaptanos.
- Compuestos de nitrógeno: NO , NO_2 , NH_3 .
- Compuestos inorgánicos de carbono: CO , CO_2 .
- Compuestos orgánicos: hidrocarburos, aldehídos, peróxidos orgánicos COV.
- Compuestos de los halógenos: ácido fluorhídrico (HF), ácido clorhídrico HCl (THALASSO y PINEDA, 2002).

2.3. Contaminación por metales tóxicos

En el caso particular de los suelos, suelen afectar la fertilidad y/o el uso posterior de los mismos, mientras que en el caso de los acuíferos y aguas superficiales, pueden comprometer seriamente el uso de este recurso como fuente de agua para el consumo humano (VULLO, 2003).

Los efectos de los metales sobre el funcionamiento de los ecosistemas varían considerablemente y son de importancia económica y de salud pública. Entre los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales tóxicos se encuentran:

1. El desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales.
2. Modificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos.
3. Ruptura de la integridad de biomoléculas.

4. Modificación de otros agentes biológicamente activos (CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2000).

Un rango distintivo de los metales tóxicos es que aún cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento como Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo, se ha reportado que tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas (CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2000).

2.3.1. Contaminación por aluminio

El aluminio natural se encuentra en el suelo formando parte de la estructura química de los aluminosilicatos presentes en muchos minerales y rocas. Estos compuestos son muy estables y por lo tanto insolubles en el medio ambiente natural (NESSE *et al.*, 2003).

Los suelos ácidos presentan altos contenidos de aluminio, manganeso e hidrógeno, elementos susceptibles de causar fitotoxicidad (MARCHNER, 1991).

El Al^{+3} , ha sido reconocido como el limitante principal para el crecimiento de los vegetales en suelos ácidos (DARKO *et al.*, 2004). En general los cationes trivalentes son tóxicos para las plantas y el Al^{+3} es considerado la mayor forma fitotóxica, aunque algunos estudios han implicado a las formas di y monovalente en la toxicidad (RITCHIE, 1995). Esto ha sido probado en soluciones nutritivas en las que la adición de cantidades máximas de este elemento produce una reducción del desarrollo del vegetal (DOMINGUEZ, 1997).

El aluminio se usa a menudo en utensilios y artículos de cocina, envases y en materiales de construcción. También se usa en pinturas, fuegos artificiales, producción de vidrios, gomas, cerámicas y en productos de consumo tales como: antiácidos, astringentes, aspirina, aditivos para cocina y desodorantes. Algunos estudios han demostrado que altos niveles de aluminio causan daño en animales antes y después de nacer porque puede retardar el desarrollo del esqueleto y del sistema nervioso (BARQUERO, 2004).

El aluminio absorbido se acumula en varios tejidos tales como hígado, huesos, cerebro, músculos estriados, además interfiere con el transporte de hierro produciendo un tipo de anemia; también disminuye la absorción del calcio originando dolores, deformaciones y fracturas en los huesos. Pasa al cerebro produciendo enfermedades neurológicas y se considera asociado a la enfermedad de Alzheimer, la cual produce un proceso degenerativo de la corteza cerebral que conduce a la demencia (GONZALES y HERNÁNDEZ, 1991).

El valor máximo permitido de aluminio para consumo en agua potable es de 0.2 mg/L tomando en cuenta normas internacionales. (OMS, 2003).

2.3.2. Contaminación por hierro

El hierro reacciona en el medio acuático, que con frecuencia se acumula en los tejidos de los organismos y causan efectos teratológicos o en muchos casos muerte de los organismos (CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2000; GARCIA *et al.*, 1993)

Altas concentraciones de hierro puede provocar conjuntivitis, coriorretinitis, y retinitis. La inhalación de concentraciones excesivas de óxido de hierro puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer al pulmón en trabajadores. (GUTIÉRREZ, 2005).

Las dosis toxicas de hierro en humanos son las siguientes:

- Toxicidad Leve: < 20 mg hierro elemental/Kg
- Toxicidad Moderada: 20 – 40 mg hierro elemental/Kg
- Toxicidad Severa: 40 – 60 mg hierro elemental/Kg
- Toxicidad Letal: >60 mg hierro elemental/kg (GUTIÉRREZ, 2005).

2.4. Contaminación en el sector La Muyuna

La generación de residuos sólidos municipales se clasifican en dos tipos: los de origen domiciliario que está íntimamente ligada al número de pobladores que existe en la localidad y los residuos no domiciliarios (generalmente es el 30% de los residuos domiciliarios) comprende los residuos producidos en comercios, restaurantes, instituciones mercados y barrido de calles, por otro lado existen los residuos no municipales peligrosos ,compuesto generalmente de atención de salud y alguna industria. En el Sector “La Muyuna”, se ha generado un problema ambiental por la acumulación de los residuos sólidos, la municipalidad provincial de Leoncio Prado recoge los residuos sólidos en la zona central de la ciudad y parte de la zona periférica aproximadamente entre 8 a 9 toneladas de basura diarias, lo que trae como consecuencia la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos (PIGARS, 2009).

QUIROZ (2006), evaluando la contaminación en el sector La Muyuna (botadero y cantera Muyuna) obtuvo en los resultados de análisis de suelos y aguas que los valores de metales encontrados superaron en algunos casos los límites máximos permisibles y estándares de calidad ambiental, encontrando para suelos: Zn (720 – 4280 ppm), Cu (8 – 216 ppm), Fe (12 – 68 ppm), Mn (8 – 36 ppm) y en aguas rangos de: Mn (3 – 7 ppm), Zn (2 – 3 ppm), Fe (0,06 - 0,41 ppm), Cu (0,03 ppm), demostrando que hay contaminación severa, con efectos directos a los recursos suelo y agua en dicho sector en estudio.

2.5. Acción de los microorganismos sobre metales tóxicos

Los procesos por los cuáles los microorganismos interactúan con los metales tóxicos son muy diversos. Existe la posibilidad del uso de bacterias con las propiedades de biodegradación, biosorción, bioacumulación o biotransformación o para metabolizar metales. La utilización de microorganismos que remuevan o transforman diferentes compuestos nocivos en otros de menor impacto ambiental ha experimentado un gran desarrollo reciente. Aunque las bacterias son las más empleadas en este proceso, también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetes para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo (DIAZ *et al.*, 2003; FOURNIER *et al.*, 2002).

Los sistemas que utilizan células vivas pueden emplear una mezcla de microorganismos (consorcios), en ese sentido CAÑIZARES-VILLANUEVA (2000) manifiestan que florecimientos de algas y bacterias fortalecidos por la adición de aguas residuales, disminuyen los metales Cu, Cd,

Zn, Hg, y Fe de efluentes mineros y asimismo un sistema de canales utilizando algas, cianobacterias y vegetales remueven Cu, Zn, Mn, Fe, Ni y Cd, de la mina Homestake (MO., EEUU).

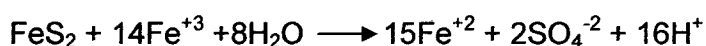
Los géneros bacterianos más comunes que remueven químicos tanto en suelos como en aguas son: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia* y *Pseudomonas sp.* (LEAHY Y COLWELL, 1990).

Según OTINIANO (2007), las *Pseudomonas sp.* poseen una gran capacidad de reducción de cromo total mediante una reacción mediada por una enzima reductasa contenida en el citoplasma; sin embargo, la capacidad de reducción de cromo VI no es muy notoria, el cromo VI se reduce de 0.37 a 0.32 ppm en 140 horas (5 días), lo que corresponde al 13.51% del cromo VI inicial.

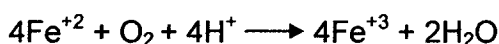
Ralstonia eutropha (*Alcaligenes eutrophus*) es una bacteria capaz de acumular metales, previa solubilización de los mismos mediante la liberación de sideróforos. Los sideróforos son péptidos con capacidad complejante que son liberados al medio con el objeto de captar Fe, que es utilizado como oligoelemento dentro del metabolismo celular. Los niveles intracelulares de hierro son controlados en las bacterias, porque su deficiencia produce una disminución del crecimiento, pero el exceso puede ser tóxico para la célula (VULLO, 2003; VENTURY *et al.*, 1995; REID y BUTLER, 1991).

La cepa *Pseudomonas fluorescens* demostró tener una alta eficiencia en la degradación de cianuro hasta una concentración de 700 mg/L, las concentraciones de 800 y 900 ppm de cianuro fueron degradadas en un muy bajo porcentaje, mientras que a una concentración de 1000 ppm, no hubo respuesta de la especie bacteriana (RESTREPO, 2006).

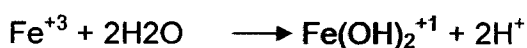
Es necesario mencionar a *Thiobacillus ferrooxidans* que es la especie bacteriana mejor conocida entre los microorganismos que exhiben la capacidad de remoción de hierro. Esta bacteria, prolifera en ambientes acuáticos contaminados con ácidos casi cercanos a pH 2.0, generalmente en drenajes ácidos de minas, es capaz de crecer autotróficamente usando el ión ferroso o compuesto de azufre reducidos como donante de electrones. La oxidación de hierro por este género bacteriano produce muy poca energía por molécula oxidada. Por dicha razón, estos microorganismos deben oxidar grandes cantidades de hierro (generalmente piritita, FeS₂) para poder crecer (DIAZ *et al.*, 2003; PARÉS, 1997).



Este microorganismo crece en medios con un pH notablemente ácido, condiciones en la que el ión ferroso, además de ser soluble es regenerado por acción del *T. ferrooxidans* a ión férrico en presencia de aire (DIAZ *et al.*, 2003; PARÉS, 1997).



El ión férrico se hace de nuevo disponible para oxidar más piritita y el ciclo continúa una vez iniciado. La solución ácida cargada de hierro pasa de un ambiente rico en sulfuros al encuentro de rocas, suelos y aguas de mayor pH (> 2,5), de esta forma, el hierro férrico producido de acuerdo con la reacción se hidroliza y genera mayor acidez.



2.6. Biorremediación

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (vegetales, hongos, bacterias, etc.) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. Esta estrategia biológica depende de sus actividades catabólicas de los organismos y por consiguiente de su capacidad para utilizar los contaminantes como fuente de alimento y energía (VAN DEUREN *et al.*, 1997).

Las reacciones responsables de los procesos de biotransformación, biodegradación y biosorción están relacionadas con el metabolismo de los microorganismos existentes. El proceso de remoción puede referirse a la completa mineralización de los contaminantes orgánicos, obteniendo como producto final dióxido de carbono (CO₂), agua, compuestos inorgánicos y componentes celulares ó a la transformación parcial de contaminantes orgánicos en otros compuestos de menor, igual ó mayor toxicidad para el ecosistema involucrado (USEPA, 1994).

Para que dichos microorganismos puedan crecer y desarrollar sus funciones vitales necesitan un aporte de nutrientes básicamente carbono, nitrógeno y fósforo; así como donantes y aceptores de electrones (PARÉS y JUÁREZ, 1997; CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2000; VAN CAUWENBERGHE Y ROOTE, 1998).

Estos organismos requieren de ciertos factores ambientales para metabolizar sustratos: humedad, oxígeno, pH, temperatura adecuada (LEAHY y COLWELL, 1990).

El parámetro primordial que afecta significativamente la tasa de remoción de un contaminante es su concentración, a muy bajas concentraciones los compuestos no generan suficiente energía para el crecimiento de los microorganismos ó no inducen el sistema enzimático necesario para su metabolismo, si se encuentran presentes otros sustratos más fácilmente biodegradables. Por otro lado, una alta concentración del contaminante puede resultar tóxica para la población microbiana autóctona del suelo, generando una disminución ó supresión en la actividad de degradación y/ó muerte de la comunidad (ALEXANDER, 1981, 1994).

2.7. Factores ambientales

2.7.1. Oxígeno

Las bacterias pueden utilizar compuestos inorgánicos como metales, para obtener energía, utilizándolos como donantes de electrones y el oxígeno como aceptor de electrones. Un claro ejemplo de como afecta la respiración aerobia a la movilidad de los metales pesados, se encuentra en la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} . El Fe^{2+} actúa como donante de electrones y el O_2 como aceptor, produciéndose precipitados de hidróxidos de hierro. Estos precipitados constituyen superficies de reacción con otros metales contaminantes, permitiendo la formación de complejos y por lo tanto la inmovilización de los contaminantes (LÓPEZ *et al.*, 2007).

Las reacciones de oxidación son las de mayor importancia en biodegradación en condiciones aeróbicas. Están catalizadas por monooxigenasas, dioxigenasas, lacasas y peroxidadas. Se requieren

condiciones aeróbicas para estas reacciones porque el oxígeno, además de funcionar como aceptor final de la respiración, es un reactivo obligado en las reacciones de transformación (ERCOLI *et al.*, 2000).

2.7.2.pH

El pH del medio es importante para el desarrollo de los microorganismos degradadores, siendo los más utilizados los comprendidos entre 6 y 8 unidades, aunque el óptimo es pH neutro. La variación del pH afecta a la actividad microbiana y también la solubilización y adsorción /absorción del contaminante e iones. Muchas bacterias no pueden tolerar niveles de pH superiores a 9.5 o inferiores a 4.0 (ERCOLI *et al.*, 2002; TCHOBANOGLIOUS, 2000).

A menor pH en suelos ácidos mayor solubilidad de los metales y por tanto mayor movilidad de éstos, con lo que se incrementa la toxicidad para los vegetales (CHICON, 2006).

El pH determina el grado de adsorción de iones por las partículas del suelo, afectando así su solubilidad, movilidad, disponibilidad y formas iónicas de un contaminante y otros constituyentes del suelo. La solubilidad de muchos contaminantes inorgánicos cambia en función del pH y normalmente su movilidad disminuye con altos valores de pH. (ALEXANDER ,1994).

SALA y GRANHEN (2001) al estudiar la aplicación de la biosorción en la remoción de cromo de efluentes de curtiembres por *Pseudomonas sp.*, determinaron que el pH de la solución tiene una influencia muy grande, logrando las mayores remociones a pH 2, mientras que la

temperatura al aumentar de 25 a 45 °C provoca una reducción en la capacidad de retención de los adsorbentes. Los investigadores justifican este comportamiento por el aumento de protones ligados a las paredes celulares que aumenta el punto isoeléctrico de muchas paredes celulares provocando un acceso más fácil de aniones a lugares cargados positivamente.

2.7.3. Temperatura

La temperatura influye en la velocidad de degradación, dependiendo del tipo de microorganismo. Generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, comúnmente las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 15 °C y 45 °C (microorganismos mesófilos), aunque se han descrito algunos trabajos de biorremediación con microorganismos termofílicos extremos y psicrófilos (FEITKENHAUER *et al.*, 2003).

Se han registrado procesos de campo en donde la temperatura del suelo empetroado alcanzó 70 °C, y se mantuvo la actividad degradadora (MAROTO y QUESADA, 2005; ERCOLI *et al.*, 2000). Además SIMS *et al.* (1990) mencionan que a temperaturas mayores a 40 °C decrece la biotransformación, debido a la desnaturalización de las proteínas y enzimas microbianas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología General de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicado en la provincia de Leoncio Prado, distrito Rupa Rupa, región Huánuco a una altitud de 660 m.s.n.m. con condiciones de temperatura promedio anual de 24.85 °C, con precipitación anual de 3200 mm y humedad relativa de 82%.

3.2. Unidades de estudio

3.2.1. Biológicos

Bacterias aisladas de muestras de suelo del sector La Muyuna, Tingo María, formadoras de consorcios capaces de degradar aluminio y hierro.

3.2.2. Químicas

Los compuestos químicos que se procesaron para la biodegradación fueron óxido de aluminio (Al_2O_3) para el caso de Al^{+3} y cloruro férrico (FeCl_3) para el estudio de Fe^{+3}

3.3. Metodología

3.3.1. Recolección de muestras

Se tomaron al azar porciones de suelo de cuatro diferentes lugares del sector La Muyuna en bolsas de plástico estériles, hasta completar

aproximadamente 250 g, las cuales se rotularon y posteriormente fueron transportados al laboratorio.

3.3.2. Aislamiento de bacterias

Las muestras de suelo se llevaron a desecar a 105 °C por 48 horas, posteriormente se procedió a molerlas.

Se realizaron diluciones decimales con diluyente de Caldo Peptona, de la última dilución (10^{-3}) se tomó una alícuota de 0.5 mL. Se sembró bacterias en placas petri que contenían Medio 77 más Manitol al 1% por diseminación con ayuda de la espátula Digraslky homogenizando sobre toda la superficie del medio, se incubó a temperatura ambiente por 48 horas.

Una vez desarrolladas las colonias bacterianas en Medio 77 se procedió a determinar el número de microorganismos (colonias) diferentes atendiendo a sus características morfológicas y propiedades de tinción para posteriormente repicarlas según su tipo en tubos con medio inclinado de Mueller Hinton-Manitol que constituirán los medios de almacenamiento de las bacterias aisladas (cepas). (AOAC, 2003)

3.3.3. Etapa de adaptación

De los cultivos de almacenamiento (cepas) de las bacterias aisladas, se tomaron por separado alícuotas con el asa de siembra de cada una de las cepas y se repicaron en igual número de matraces con 50 mL de Caldo BHI (caldos de reactivación) incubándolos por 48 horas a temperatura ambiente.

Para el proceso de la etapa de adaptación, 1 mL de los caldos de reactivación, de cada una de las cepas, se adicionaron a tubos conteniendo 10 mL de Medio Mínimo de Sales (MMS) (ANEXO 1), considerándose un tubo por concentración a probar, y se adicionó el compuesto químico a degradar a concentraciones de 20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L y 35 mg/L, 40 mg/L en el caso de aluminio y para hierro concentraciones de 2 mg/L, 2.5 mg/L, 3.0 mg/L, 3.5 mg/L, 4.0 mg/L.

Se llevaron a incubación a temperatura ambiente por 48 horas, al término de este período se seleccionaron los cultivos desarrollados sobre los medios con mayor concentración del químico.

3.3.4. Bacterias en consorcio

De los cultivos desarrollados en MMS con mayor concentración del químico en estudio, se tomaron alícuotas con la ayuda del asa de siembra, colocándolas en un matraz con Caldo Nutritivo más Manitol al 1 % (CNM) para su desarrollo en cultivo mixto (consorcio), constituyéndose este matraz en el cultivo patrón (o stock) para la obtención de los inóculos de siembra en la etapa de degradación. (Grant, 1981 mencionado LOPEZ 2006).

3.3.5. Etapa de operación en biorreactores

En matraces de 1 L se preparó MMS, que se añadió a biorreactores tipo air lift, (ANEXO 2), en un volumen de 600 ml. Al poner en funcionamiento la fuente de aireación se inició la operación teniendo como filtro

del aire una solución de NaCl al 20%, luego se añadió a cada biorreactor 6 mL de glucosa y 6 mL extracto de levadura como iniciadores de crecimiento.

Así mismo se agregó a los biorreactores los químicos en concentraciones de 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L para aluminio y de 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L y 20 mg/L para hierro, se añadieron las bacterias en consorcio contenidas en CNM a todos los biorreactores en una cantidad de 60 mL de inóculo.

3.3.6. Datos registrados

Con la finalidad de determinar el rendimiento del consorcio de bacterias utilizado en la biodegradación de aluminio (Al^{+3}) y hierro (Fe^{+3}) en estudio, se tomaron los siguientes datos:

3.3.6.1 Oxígeno disuelto

Se determinó semanalmente con ayuda del oxímetro (electrodo de membrana) poniendo el medidor en marcha y sumergiendo el electrodo en muestras obtenidas de los biorreactores en operación, adaptando el método descrito por APHWA (1992). Los resultados se reportan en mg/L.

3.3.6.2. Dióxido de carbono

La producción de CO_2 , se determinó semanalmente mediante el método descrito por HACH (2002). Para ello se inserto a un tubo dispensador limpio un cartucho de hidróxido de sodio de 0.3636 N. Se enroscó el cartucho hacia el cuerpo del titulador.

Luego se llenó el tubo dispensador por rotación de la perilla hasta que al final del tubo dispensador comenzó a fluir unas cuantas gotas de líquido se limpió la punta y se volvió a poner el contador a cero. Se tomó efluentes de biorreactores en un tubo graduado de 100 ml., luego se vertió en un matraz erlenmeyer de 250 ml y se agregó el contenido del cojín de indicador de fenolftaleína en polvo, se agitó para homogenizar la muestra.

Para titular se agitó suavemente el matraz a la vez que se vertían gotas de NaOH desde el dispensador hasta dar un color rosado ligero que persistió por 30 segundos, se procedió a leer el número de dígitos en el contador digital y se dividió el número entre cinco para determinar el dióxido de carbono en mg/L.

3.3.6.3. Temperatura

La temperatura interna de operación se midió con ayuda de un termómetro. Los datos fueron tomados semanalmente.

3.3.6.4. Determinación del pH

Se determinó con ayuda del potenciómetro o pH-metro (EXTECH) debidamente calibrado (Método N° 11.032 de la AOAC, 1996).

3.3.6.5. Densidad celular en consorcio

Los consorcios bacterianos tanto para aluminio como para hierro se hicieron desarrollar en tubos con Caldo Nutritivo más Manitol al 1% (CNM), para un recuento inicial se diluyeron hasta 10^{-7} y se depositaron en placas con

Medio de Plate Count, luego de incubación a temperatura ambiente por 72 horas se procedió a determinar la densidad celular por la enumeración de colonias desarrolladas.

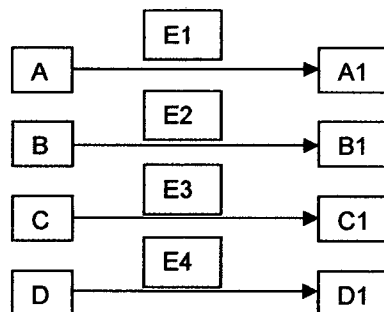
Durante la operación con los biorreactores, se determinó asimismo la densidad celular semanalmente. Los resultados se expresaron en células por mililitro (cél/mL).

3.3.6.6. Concentración del químico

La degradación de aluminio y hierro se determinó mediante lecturas en el espectrofotómetro de absorción atómica aa/ae spectrophotometer a una longitud de onda de 309.3 nm para aluminio y 249 nm en el caso de hierro.

3.4. Diseño experimental

El diseño del trabajo se adecua a una investigación tipo experimental de estímulo creciente con cuatro concentraciones por cada químico estudiado, según el siguiente esquema:



Donde:

A, B, C, D : Bacterias en consorcio

E1, E2, E3, E4 : Concentraciones de trabajo para Al^{+3} y Fe^{+3}

A1, B1, C1, D1 : Resultados

3.5. Ajuste estadístico

Los resultados obtenidos de los cuatro tratamientos con tres repeticiones para cada químico, se ajustaron matemáticamente con un diseño estadístico completamente al azar (DCA) para verificar su significación utilizando el programa Statgraphics 5.1 y la comparación de medias según Tukey.

Los tratamientos fueron los siguientes:

Químico: Al^{+3}

T₁: 50 mg/L de concentración

T₂: 100 mg/L de concentración

T₃: 150 mg/L de concentración

T₄: 200 mg/L de concentración

Químico: Fe^{+3}

T₁: 5 mg/L de concentración

T₂: 10 mg/L de concentración

T₃: 15 mg/L de concentración

T₄: 20 mg/L de concentración

IV. RESULTADOS

4.1. Bacterias en consorcio

Con la metodología especificada se aislaron y posteriormente identificaron (ANEXO 3) los géneros bacterianos en consorcio que desarrollan en presencia de aluminio: *Arthrobacter sp* y *Alcaligenes sp* y de Hierro: *Gallionella sp* y *Alcaligenes sp*, que se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Especies bacterianas en consorcio desarrolladas en presencia de aluminio y hierro.

Químico	Especie Bacteriana
Aluminio	<i>Arthrobacter sp.</i>
	<i>Alcaligenes sp.</i>
Hierro	<i>Gallionella sp.</i>
	<i>Alcaligenes sp.</i>

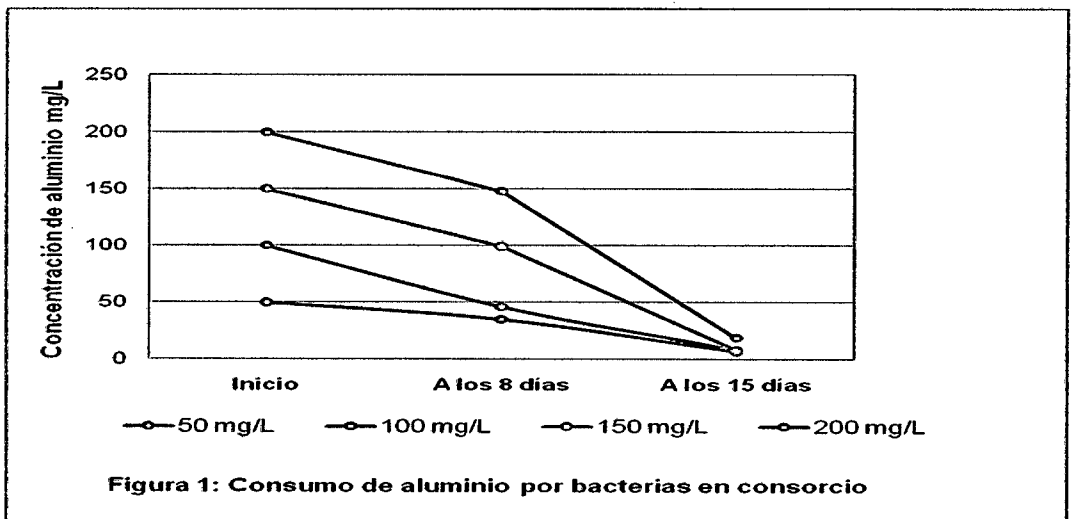
4.2. Biodegradación de aluminio y hierro

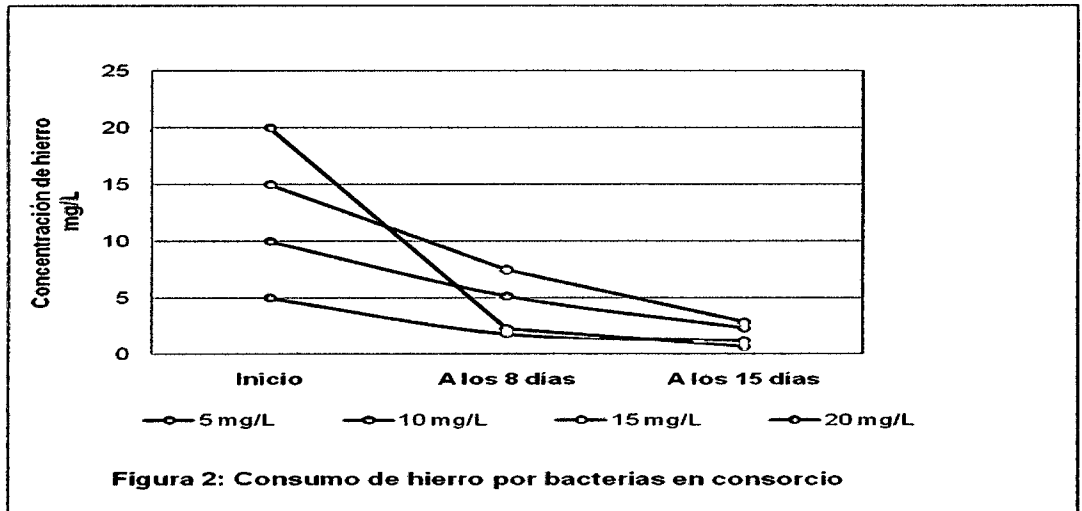
En el Cuadro 2 se anotan los resultados de las lecturas de las concentraciones de aluminio y de hierro presentes en los biorreactores, a los 8 y 15 días de iniciado el desarrollo bacteriano, obtenidas en espectrofotómetro de absorción atómica para determinar la degradación de aluminio ($\lambda = 309.3$ nm) y hierro ($\lambda = 249$ nm).

Cuadro 2. Concentraciones de aluminio y hierro presentes en los biorreactores a los 8 y 15 días de iniciada la operación.

Químicos	Concentración (mg/L)		
	Inicial	8 días	15 días
Aluminio	50	15	8
	100	54	46
	150	51	43
	200	52	33
Hierro	5	3.2	2
	10	4.8	2.43
	15	7.5	4.6
	20	17.7	17

En las Figuras 1 y 2 se presentan los datos del consumo de los químicos aluminio y hierro en cada una de las concentraciones probadas realizado por bacterias en consorcio, a los 8 y 15 días de iniciada la operación en los biorreactores.





Cuadro 3. Porcentaje de degradación de aluminio y hierro mediada por bacterias en consorcio

Químicos	Concentración (mg/L)	Degradación (mg/L)	%
Aluminio	50	42	84
	100	54	54
	150	107	71.3
	200	167	83.5
Hierro	5	3	60
	10	7.57	75.7
	15	10.4	69.3
	20	3	15

4.3. Densidad celular (DC) y producción de CO₂

Los resultados de la enumeración de bacterias desarrolladas en consorcio se expresan en células por mililitro (cél/mL) y la producción de CO₂ en mg/L, estos resultados se señalan en los Cuadro 4 y 5, mostrando mayor

producción de CO₂ a partir del desarrollo en presencia de aluminio y hierro a los 15 días de la evaluación.

En cuanto a la densidad celular se incrementó la producción de CO₂ aumenta hasta los 8 días de iniciado el desarrollo bacteriano, en tanto que a los 15 días para las concentraciones 150 mg/L y 200 mg/L tanto en el caso de aluminio como y en el caso de hierro, la densidad celular disminuye no así la producción de CO₂.

Cuadro 4. Densidad celular y producción de CO₂ de bacterias en consorcio en presencia de aluminio.

Tiempo	Concentración (mg/L)		Densidad Celular	CO ₂
	Inicial	Restante	x 10 ⁻⁷ cél/mL	mg/L
Día 1	50	50	378.67	0.3
	100	100		0.103
	150	150		0.133
	200	200		0.167
Día 8	50	15	1840	1.5
	100	54	1822	2.78
	150	51	706	2.65
	200	52	648	2.55
Día 15	50	8	1045	3.5
	100	46	1002	3.37
	150	43	412	3.8
	200	33	306	4.2

Cuadro 5. Densidad celular y producción CO₂ de bacterias en consorcio en presencia de hierro.

Tiempo	Concentración (mg/L)		Densidad Celular x 10 ⁻⁷ cél/mL	CO ₂ mg/L
	Inicial	Restante		
Día 1	5	5	746.67	0.93
	10	10		0.103
	15	15		0.1083
	20	20		0.135
Día 8	5	3.2	1568	1.71
	10	4.8	1392	2.8
	15	7.5	576	2.83
	20	17.7	565	2.78
Día 15	5	2	1100	4.07
	10	2.43	960	3.93
	15	4.6	325	3.0
	20	17	285	3.87

4.3. Determinación de Oxígeno Disuelto

Los resultados de la determinación de la concentración de oxígeno disuelto en los biorreactores air lift con bacterias en consorcio para la degradación de aluminio se reportan en el Cuadro 6, destacándose mayores concentraciones de oxígeno disuelto al iniciar la operación y paulatina disminuyen a los 8 días del arranque, en tanto que transcurridos 15 días las concentraciones de oxígeno disuelto tienden a disminuir considerablemente concentraciones altas del químico (150 mg/L y 200 mg/L), verificándose un mayor consumo de oxígeno (2.57 mg/L y 2.96 mg/L).

Cuadro 6. Concentración de oxígeno disuelto en los biorreactores con bacterias en consorcio en presencia de aluminio.

Concentración Aluminio (mg/L)	Concentración de oxígeno disuelto (mg/L)				
	Inicio	8 días		15 días	
		Medida	Consumo	Medida	Consumo
50	5.3	4	1.3	3.32	1.98
100	5.22	3.7	1.32	3.29	1.93
150	5.17	3.8	1.37	2.6	2.57
200	5.36	3.98	1.38	2.4	2.96

Asimismo la concentración de oxígeno disuelto en los biorreactores air lift con bacterias en consorcio para la degradación de hierro se indican en el Cuadro 7, observándose mayores concentraciones de oxígeno disuelto al inicio de la operación y a los 8 días del mismo, con un consumo similar en todas las concentraciones probadas. En cambio, que cumplidos 15 días las concentraciones de oxígeno disuelto tienden a disminuir en concentraciones bajas del químico (5 mg/L y 10 mg/L), verificándose un mayor consumo de oxígeno, en tanto que en las concentraciones mayores (15 mg/L y 20 mg/L) el consumo de oxígeno es menor (0.42 mg/L y 0.32 mg/L).

Cuadro 7. Concentración de oxígeno disuelto en los biorreactores con bacterias en consorcio en presencia de hierro.

Concentración hierro (mg/L)	Concentración de oxígeno disuelto (mg/L)				
	Inicio	8 días		15 días	
		Medida	Consumo	Medida	Consumo
5	5.27	3.98	1.39	3.27	0.63
10	5.4	4	1.4	3.38	0.62
15	5.42	4.1	1.37	3.68	0.42
20	4.87	3.52	1.35	3.2	0.32

4.5. Temperatura

La temperatura interna de operación fue en promedio de 25.8 °C medida con termómetros, la temperatura externa general osciló entre 24.8° a 25.9° y se determinó con un termómetro ambiental.

Cuadro 8. Temperatura externa e interna durante la operación en biorreactores air lift con bacterias en consorcio en presencia de aluminio.

Concentraciones	Temperatura (°C)					
	Inicial		8 días		15 días	
	Externa	Interna	Externa	Interna	Externa	Interna
50	24.8	25	25.9	26.5	25.1	26.4
100	24.8	24.9	25.9	26.3	25.1	26
150	24.8	24.8	25.9	26.2	25.1	26
200	24.8	25.1	25.9	26.8	25.1	26.5

Cuadro 9. Temperatura externa e interna durante la operación en biorreactores air lift con bacterias en consorcio en presencia de hierro.

Concentraciones	Temperatura (°C)					
	Inicial		8 días		15 días	
	Externa	Interna	Externa	Interna	Externa	Interna
5	24.8	24.9	25.9	26.1	25.1	26
10	24.8	25.1	25.9	26.7	25.1	26.2
15	24.8	25	25.9	26.4	25.1	26.1
20	24.8	24.8	25.9	26	25.1	26

4.6. Determinación del pH

Se determinó el pH, con el pHmetro EXTECH debidamente calibrado, los resultados de las mediciones al inicio, a los 8 y a los 15 de iniciado el proceso se anotan en los Cuadros 10 y 11, donde se aprecian que

los pH más bajos se obtuvieron en los biorreactores con bacterias en consorcio desarrollándose sobre concentraciones de 15 mg/L y 20 mg/L de hierro.

Cuadro 10. Determinación del pH en el desarrollo de bacterias en consorcio en presencia de aluminio

Concentraciones (mg/L)	pH		
	Inicio	8 días	15 días
50	7.43	7	6.77
100	7.65	7.3	7.39
150	7.6	7.1	6.7
200	7.48	7.4	7.19

Cuadro 11. Determinación del pH en el desarrollo de bacterias en consorcio en presencia de hierro.

Concentraciones (mg/L)	pH		
	Inicio	8 días	15 días
5	6.6	6.2	6.09
10	5.54	5.33	5.22
15	3.52	3	2.62
20	3.27	3.1	2.56

4.7. Ajuste estadístico

4.7.1. Biodegradación de aluminio

La evaluación de los resultados de la biodegradación de aluminio con respecto al análisis de varianza se anota en el Cuadro 12, indicando la respectiva prueba de Tukey donde se aprecia la diferencia entre los cuatro tratamientos.

Cuadro 12. Análisis de varianza para biodegradación de aluminio

Fuente	Suma de cuadrado	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F calculado	P
Tratamiento	29336.9	3	9778.97	2444.74	0.0000
Error	32.0	8	4.0		
Total	29368.9	11			

Prueba de Tukey

Tratamientos	Promedios	Grupos homogéneos
4	166.667	A
3	107.333	B
2	53.666	C
1	42.0	D

Se observan diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos, y en el Cuadro 14 se presenta el ANVA y la prueba de Tukey observándose que todos los tratamientos son estadísticamente diferentes siendo el tratamiento 4 el que obtuvo mejor resultado con un valor de (166.667

mg/L) seguido por el tratamiento 3 (107.333mg/L) mientras que el tratamiento 1(42.0mg/L) tuvo el menor valor hasta los quince días.

4.7.2. Biodegradación de hierro

La evaluación de los resultados de biodegradación de hierro luego de 8 y 15 días, respecto al análisis de varianza se anota en el Cuadro 13, indicando la respectiva prueba de Tukey donde se aprecia la diferencia entre tratamientos 3 y 2 con respecto a 1 y 4 que son similares.

Cuadro 13. Análisis de varianza para Biodegradación de hierro

Fuente	Suma de		Cuadrado		
	Cuadrado	Grados de libertad	Medio	F calculado	P
Tratamiento	114.814	3	38.271	3252.53	0.000
Error	0.0941333	8	0.0117667		
Total	114.908	11			

Prueba de Tukey

Tratamientos	Promedios	Grupos homogéneos
3	10.266	A
2	7.57	B
4	3.06667	C
1	3.0	C

En estos resultados se puede observar que existen diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos, se procedió a realizar la prueba de Tukey en la cual se observa que el tratamiento 3 presentó mayor consumo (10.266mg/L) y fue estadísticamente diferente a los demás, seguido del tratamiento 2 con consumo de (7.57mg/L) siendo estadísticamente diferentes a los demás ,por tanto los tratamientos 4 y 1 con valores de (3.06mg/L y 3mg/L) respectivamente no tuvieron diferencia estadística entre ellos ,pero fueron diferentes con respecto a los tratamientos 3 y 2.

V. DISCUSIÓN

Los géneros bacterianos en consorcio obtenidos en las pruebas de degradación de aluminio y hierro coinciden con LEAHY Y COLWELL (1990) quienes mencionan que las especies bacterianas degradadores de químicos más comunes tanto en suelos como en aguas pertenecen a los géneros: *Alcaligenes* y *Arthrobacter* además de *Bacillus*, *Nocardia* y *Pseudomonas*. Del mismo modo, con VULLO (2003), REID y BUTLER (1991) y VENTURY *et al.* (1995) mencionan que la bacteria *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) es capaz de acumular metales, previa solubilización de los mismos mediante la liberación de sideróforos.

Los microorganismos encontrados en el presente estudio presentan capacidad de desarrollar en presencia de hierro y aluminio en concentraciones bajas y moderadas y menos desarrollo a concentraciones elevadas. Esto se debe a que las propiedades metabólicas son inherentes a todo ser vivo, la activación de enzimas inducibles sumadas a las constitutivas median la catálisis de sustancias de diversa índole que entran en adsorción con las células microbianas, transformándolas en compuestos fragmentados capaces de ser absorbidos en el interior celular en donde enzimas reductasas específicas de sustrato y posteriormente oxidasas degradan los componentes a sus unidades conformacionales proporcionalmente a sus concentraciones y luego por ciclos oxidativos o fermentativos son convertidos en energía y masa

celular (PARÉS y JUÁREZ, 2000; ERCOLI *et al.*, 2000; VAN CAUWENBERGHE y ROOTE, 1998).

En tal sentido, OTINIANO (2007) reporta *Pseudomonas sp.* con capacidad de reducción de cromo total mediante una reacción mediada por una enzima reductasa contenida en el citoplasma. LÓPEZ (1996), en un estudio de transformación de xenobióticos clorados por biopelículas de *Pseudomonas sp.* refiere la ocurrencia de enzimas tipo monooxigenasas y dioxigenasas como responsables de la fragmentación de esos compuestos tóxicos.

Los microorganismos que desarrollan en presencia de Al^{+3} y Fe^{+3} , pueden presentar metabolismo con acción catalítica de reductasas, oxigenasas e hidrolasas que facilitarían la biosorción del metal e incluso su asimilación a sus ciclos bioquímicos dando lugar posiblemente en una conversión total a productos inocuos o a inmovilización del mismo debido a que no se ha detectado efecto tóxico sobre el crecimiento y desarrollo de los microorganismos hasta la quince días de iniciada la operación.

Es posible que los microorganismos desarrollados en presencia de aluminio y hierro sean influenciados por la concentración del componente a degradar y los factores ambientales en simultáneo con la naturaleza que son importantes para la activación del mecanismo metabólico (LEAHY y COLWELL, 1990; ALEXANDER, 1981, 1994).

Refiriéndonos a la concentración del tóxico y a la capacidad de biodegradación mediada por microorganismos en consorcio, no necesariamente con los mismos compuestos, coincidimos con RESTREPO (2006) quién reportó que concentraciones moderadas (700 mg/L) de cianuro

fueron degradadas en un alto porcentaje por *Pseudomonas fluorescens*, en tanto que concentraciones mayores (800 mg/L hasta 1000 mg/L) a bajo o nulo porcentaje; y concordamos asimismo con OTINIANO (2007) quien manifestó que *Pseudomonas sp.* reducía Cromo VI en un 13.51% a bajas concentraciones (0.37 a 0.32 ppm). Podemos afirmar que los microorganismos muestran mayor actividad degradadora en menores y moderadas concentraciones del tóxico y mucho más reducida o casi nula en concentraciones altas.

Los valores máximos permitidos de hierro disociado presente en agua según la OMS (2003) no deben superar 0.2 mg/L, en tanto que para hierro concentraciones de 20 mg/Kg a mas ya son consideradas tóxicas. Si bien naturalmente el hierro en grandes concentraciones es oxidado a pH muy bajos por *Thiobacillus ferrooxidans* mediante un metabolismo autotrófico, los compuestos químicos Al_2O_3 y $FeCl_3$ utilizados en nuestro estudio permitirían la disociación de aluminio y de hierro respectivamente, presumiendo que las bacterias en consorcio reducen Al^{3+} y Fe^{3+} , que son cationes tóxicos para seres vivos, a formas de menor toxicidad (CAÑIZARES-VILLAUEVA, 2000).

Respecto a la degradación de hierro y aluminio mediada por consorcios de bacterias, la literatura consultada es aún escasa, refiriéndose puntualmente a los procesos en los cuales la acumulación de estos metales trae consecuencias negativas en los seres vivos principalmente en humanos (DARKO *et al.*, 2004; BARQUERO, 2004; RITHIE, 1995; MARCHNER, 1991, GONZÁLES y HERNÁNDEZ, 1991).

Teniendo en cuenta que los efectos de los metales tóxicos sobre el funcionamiento de los ecosistemas varían considerablemente y son de importancia económica y de salud pública (CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2000), es posible que en la zona de La Muyuna, los metales tóxicos expresen su toxicidad por el desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales o por modificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos o también por la ruptura de la integridad de biomoléculas y modificación de otros agentes biológicamente activos.

Un aspecto que no debemos descartar es que muchos metales tóxicos (incluso pesados) a pesar de ser esenciales para el crecimiento y fisiología de organismos, también tienen efectos tóxicos sobre las células principalmente por su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas (RICHIE, 1995).

Si consideramos los resultados obtenidos después de la operación en biorreactores air lift, es factible suponer que las bacterias en consorcio podrían haber degradado los químicos tóxicos a elementos menos activos o habrían captado (biosorción) los metales tóxicos a través de sus mecanismos de adsorción o por intercambio iónico, por lo que coincidimos con CAÑIZARES-VILLANUEVA (2000) quien menciona que biomasa de microorganismos con capacidad de biosorción desarrollados en biopelículas, se probaron para la eliminación de metales tóxicos entre ellos Ag, Al, Au, Co, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, U y Zn a partir de efluentes contaminados.

Asimismo los factores ambientales condicionantes de crecimiento entre ellos el pH, ha servido de indicador de absorción en el caso del hierro, puesto que las bacterias en consorcio acidificaron el medio de cultivo al posiblemente hidrolizar y producir metabolitos (H^+) en proporción a la concentración del tóxico utilizado y a la densidad celular desarrollada, coincidiendo con lo argumentado por CAÑIZARES-VILLANUEVA (2000) y OTINIANO (2006) que justifican este comportamiento por el aumento de protones ligados a las paredes celulares que aumenta el punto isoeléctrico de ellas provocando un acceso más fácil de aniones a lugares cargados positivamente.

Por otro lado, para el caso de hierro el pH ha pasado de la neutralidad a ligera acidez en todas concentraciones probadas, que al relacionarlo con la densidad celular obtenida manifiesta un desarrollo de naturaleza típica (PARÉS y JUAREZ, 1997).

La temperatura tanto para el desarrollo de bacterias en consorcio en presencia de aluminio como con hierro, se ha mantenido constante, lo que ha permitido una degradación o biosorción notoria según los resultados obtenidos, atendiendo a que las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos siendo comúnmente las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 15 °C y 45 °C (FEITKENHAUER *et al.*, 2003).

Refiriéndonos a la densidad celular obtenida en relación a la utilización del oxígeno (OD) y producción de CO_2 podemos afirmar que el comportamiento ha sido dentro de los cánones normales de desarrollo, es decir al incrementarse la biomasa microbiana el oxígeno presente en el medio de

cultivo tiende a disminuir y se incrementa la presencia de CO₂. Por lo que las bacterias en consorcio en el presente ensayo han actuado sobre el aluminio y hierro, dando características de desarrollo, si bien es cierto no en su totalidad, acorde con la cinética de crecimiento microbiano (PARÉS y JUAREZ, 1997).

VI. CONCLUSIONES

1. Las bacterias del suelo del sector La Muyuna, demostraron tener capacidad de degradar aluminio y hierro.
2. El Al^{+3} a concentraciones 150 mg/L y 200 mg/L fue más utilizado por bacterias en consorcio, en comparación con las concentraciones 50 mg/L y 100 mg/L que presentan una menor degradación por estas bacterias, en biorreactores air lift.
3. Para Fe^{+3} se verificó mayor degradación para las concentraciones 10 mg/L y 15 mg/L, siendo menor la utilización en las concentraciones 5 mg/L y 20 mg/L por parte de bacterias en consorcio, en biorreactores air lift.

VII. RECOMENDACIONES

1. Probar la capacidad de biodegradación de las bacterias del sector La Muyuna sobre otros metales tóxicos detectados en dicha zona.
2. Realizar trabajos de investigación con otras especies microbianas con propiedades biodegradativas.
3. Realizar pruebas de diferenciación electroforética como PCR, para ARN y ADN, para comprobar si las bacterias son distintas tanto fisiológicamente como taxonómicamente.
4. Realizar pruebas de espectrofotometría de masa para verificar la reducción exacta de los metales tóxicos.

VIII. ABSTRACT

The aim of this study was to determine the ability of native bacteria from Moyuna area at Tingo María to degrade metals such Al^{+3} and Fe^{+3} present in soils. Airlift bioreactors were used in which glucose, yeast extract and bacteria inoculum in consortium were added. Operation time was 15 days. To monitor biodegradation the dissolved oxygen, carbon dioxide, temperature, pH, cellular density in consortium were evaluated. Al^{+3} and Fe^{+3} readings were performed in atomic absorption spectrophotometer, determined that for Al^{+3} in treatment 4 had the highest removal (166.667 mg/mL) followed by treatment 3 (107.333 mg/mL) whereas treatment 1 had a lower value until the fifteen days and for Fe^{+3} treatment 3 showed the highest removal (10.266 mg/ml) and was statistically different from the others, followed by treatment 2 (7.57 mg/ml) being statistically different from the others. In conclusion treatment 4 and 1 (3.06 mg/ml and 3 mg/ml respectively) had no statistical difference between them, being different respect treatment 3 and 2.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC 2003, 18th Ed, 991.14 A,B,C,D

AOAC, 1996 Método N° 11.032

APHA, AWWA, WPCF 1992. Standard methods for examination of water and wastewater. American Public Health Association. 18th ed. New York.

ACURIO, G., ROSSIN, A., TEIXEIRA, P., ZEPEDA, F. 1997. Diagnóstico de la Situación del Manejo de Residuos Sólidos Municipales en América Latina y El Caribe. Washington, D.C. [En línea]: www.iadb.org/sds/doc/ENV107ARossinE.pdf. Julio de 1997)

ALEXANDER, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, San Diego, 302 pp.

BAIRD, C. 1999. Environmental Chemistry. 2nd Ed. W.H. Freeman & Company

BARQUERO, M. 2004. Comparación de metodologías voltamperométricas adsorptivas para la determinación de aluminio en agua potable Tecnología en Marcha, Vol. 18, N° 1.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista Latinoamericana de Microbiología (2000) 42: 131-143.

CASTILLO, F., ROLDÁN, M., BLASCO, R., HUERTAS, M., CABALLERO, F., MORENO, C., LUQUE, M. 2005. Biotecnología Ambiental. Editorial TEBAR, S.L. Madrid. 616 p.

- CHICÓN, L. 2006. Especiación de metales pesados en lodos de aguas residuales de origen urbano y aplicación de lodos digeridos como mejoradores de suelos. Trabajo de investigación del Programa de Doctorado en Ingeniería Ambiental de la Universidad de Málaga.
- CRITES, R y TCHOBANOGLOUS, G. 2000. Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones. Mc Graw Hill. Interamericana, S.A. Bogotá Colombia
- DARKÓ, E., AMBRUS, H., STEFANOVITS-BÁNYAI, E., FODOR, J., BAKOS, F., BARNABÁS, B. 2004. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. *Plant Science* 166:583-591.
- DIAZ, A., ARIAS, J., GELVES, G., MALDONADO, A., LAVERDE, D., PEDRFAZA, J. y ESCALANTE, H. 2003. Biosorción de Fe, Al y Mn de drenajes ácidos de mina de carbón empleando *Sargassum sp.* en procesos continuos. *Revista Facultad de Ingeniería de Antioquia*, diciembre, N° 30, pp. 34 – 48.
- DOMINGUEZ, A. 1997. Tratado de fertilización. Madrid, España Mundi-Prensa. 613 p
- ERCOLI, G., GÁLVEZ, J., DI PAOLA, P., CANTERO, J., VIDELA, S., MEDAURA, M., BAUZÁ, J. 2002. Análisis y evaluación de parámetros críticos en la biodegradación de hidrocarburos en suelo. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza. Argentina. pp 10
- EWEIS, J., ERGAS, S., Chang, D., Schroeder, E. 1998. *Bioremediation Principles*. McGraw-Hill International Editions. 296 pp.

- FEITKENHAUER, H., MÜLLER, R., MÄRKL, H. 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60-70 degrees C by *Thermus* and *Bacillus* spp. Laboratory of Chemical Engineering and Industrial Chemistry, Zürich, Switzerland. [En línea]: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14669867>, Febrero del 2004)
- FOURNIER, D., HALASZ, A., SPAIN, J., FIURASEK, P., HAWARI, J. 2002. Determination of key metabolites during biodegradation of hexahydro 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine with *Rhodococcus* sp. Strain DN 22. *Applied and Environmental Microbiology* 68:166-172
- GARCÍA, M. 1993. Guía Técnica para Minimización de Residuos en curtiembres. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria
- GONZÁLEZ, M. 1991. Determinación de aluminio en el agua potable de Valencia y localidades cercanas. Departamento de Química Tecnológica. Universidad de Carabobo.
- GULSON, B.L., MIZON K.J., KORSCH M.J. Y HOWARTH D. 1996. Non-orebody sources are significant contributors to blood lead of some children with low to moderate lead exposure in a major mining community. *The science of the total environment*. 181: 223-230.
- GUTIÉRREZ, M. 2005. Centro de Información y Asesoría Toxicológica CIATOX. Ministerio de la Protección Social. Universidad Nacional de Colombia.
- HACH, 2002. Manual de acuicultura de agua dulce, procedimientos para el Kit de prueba modelo FF-2.

- HILL, M. 1997. Understanding Environmental Pollution. Cambridge Universidad. Press
- KABATA-PENDIAS A. Y PENDIAS H. 2001. Trace elements in soils and plants
CRC. Press, Florida.
- LEAHY, J., Colwell. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews. 54 pp 305 – 315
- LÓPEZ, J., GARCÍA, O., GRIMA, J., BALLESTEROS, B., PÉREZ, M. 2007. Técnicas de biorrecuperación in situ en acuíferos contaminados por metales pesados. Instituto Geológico y Minero de España. Oficina de Proyectos de Valencia
- LÓPEZ, C., VIVAR, L., MAZABEL, C., GARCIA, R., SIAS, R. 2006. Biorremediación de contaminantes por fermentación sumergida utilizando biopelículas de microorganismos nativos de suelos tropicales de la zona de Tingo. Facultad de Recursos Naturales de la Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María- Perú
- MAIER, R., PEPPER, I., GERBA, C. 2000. Microorganisms and organic pollutants. In Environmental Microbiology. Academic Press, ed Canada. pp 363 – 400
- MAROTO, M. y ROGEL, J. 2005. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos . Protección ambiental de Suelos.
- MARSCHNER, H. 1991. Mechanisms of adapattion of plants to acid soil. Plant and soil. 134:1-20.
- MIRANDA, H., ROBLES, H. 2007. Diseño de Biorreactores.

- NESSE, A., GARBOSSA, G., PÉREZ, G., VITTORI, D., PREGI, N. 2003. Aluminio Laboratorio de Análisis Biológicos. Departamento de Química Biológica, facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [En línea]: (www.quimicaviva@qb.fcen.uba.ar. 2 de abril 2003)
- ODUM, E., 1986 Ecología. Editorial. CECSA. México,
- OMS, 2003: Aluminium in drinking-water. Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud (WHO/SDE/WSH/03.04/53).
- OROZCO, C., PÉREZ, A., GONZÁLEZ, M., RODRÍGUEZ, F., ALFAYATE, J. 2005. Contaminación ambiental: una visión desde la química. Primera edición. Editores Paraninfo S.A. España. Madrid. pp 453 – 450.
- OTINIANO, M., TUESTA, L., ROBLES, H., LUJÁN, M., CHAVEZ, M. 2007. Biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas sp* y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*: 30 de Abril 2007.
- PARÉS, R., y JUARÉZ, A. 1997. Bioquímica de los microorganismos Editorial Reverté, S.A. Barcelona.
- PIGARS, Plan Integral de Gestión Ambiental de Residuos Sólidos de la Provincia de Leoncio prado 2009 Tingo María.
- QUIROZ ,J 2006 “Evaluación de la contaminación en el suelo y agua, del sector la Muyuna, causada por los residuos sólidos producidos por el centro poblado de Castillo grande; Leoncio prado Huánuco ”

- REID, R., LIVE, D., FAULKNER, D., BUTLER, A. 1993. A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant. *Nature* 366: 455-458.
- RESTREPO, O., MONTOYA, C., MUÑOZ, N. 2006. Degradación microbiana de cianuro procedente de plantas de beneficio de oro mediante una cepa nativa de *P. fluorescens*. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. [En línea]: (<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/html>. *Revista Científica*, 15 de febrero de 2006)
- RITHCIE, G. 1995. Soluble aluminium in acidic soils: principals and practicalities. *Plant Soil* 171 (1): 17-27
- SALA, E., GRANHEN, C., KAKUTA, T. 2001. Uso da Biossorção na Remoção de Cromo de Efluente de Curtumes. Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Engenharia Química, Maringá-PR-Brasil.
- SERRANO, J y COL, H. 2006. Protección Ambiental y producción limpia. Parte 1 y 2 Editorial Academia pp16
- THALASSO, F y PINEDA, R. 2002. Biofiltración: tratamiento biológico de aire contaminado. *Avance y Perspectiva*. Vol 21 pp 325 – 32
- TYLER, G. 1999 *Ecología y Medio Ambiente*. Editorial Iberoamerica, S.A. México
- VAN, L and ROOTE, D. 1998. Technology verview Reports In situ Bioremediation. Available at. [En línea]: (<http://www.gwrtac.org>)
- VAN DEUREN, J., WANG, Z., LEDBETTER, J. 1997. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª Ed. Technology Innovation Office. [En línea]: (<http://www.epa.gov/tio/remed.htm>).

VENTURY, V., WISBEEK, P., KOSTER, M. 1995. Gene regulation of siderophore-mediated iron acquisition in *Pseudomonas*: not only the *fur* repressor. *Mol. Microbiol.* 17: 603-610.

VULLO, D. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. [En línea]: (<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm>. Revista química. 12 de noviembre de 2003)

X. ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo

Medio Mínimo de Sales

K_2HPO_4	0.08g/L
KH_2PO_4	0.2 g/L
$CaSO_4.H_2O$	0.05g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0.5g/L
$FeSO_4.H_2O$	0.1g/L
$(NH_4)_2SO_4$	1.0g/L

Se agrego 1.5 g/L de glucosa monohidratada, con un pH de 7 y se esterilizo en autoclave a 15 p.s.i y 121 grados C, por 15 minutos.

Anexo 2. Construcción de Biorreactores

Los biorreactores se construyeron, utilizando materiales domésticos como frascos de vidrio de 1000 ml de capacidad, varillas de vidrio duro de 200 mm de largo, tubo hueco de 150 mm de largo por 75 mm de ancho, material microporoso de 20 mm de espesor por 250 mm de diámetro, tubos huecos de 10 mm de diámetro por 100 mm de largo. Llevará una piedra dispensadora de aire. La fuente de aireación lo constituirá una bomba de aire de pecera (AIR PUMP JUNIOR) la que proporcionará aproximadamente unos 1100 c.c/min (LÓPEZ, 2006)

ANEXO 3. Pruebas Bioquímicas de diferenciación en Bacterias de aluminio ⁺³

COLONIAS	INDOL	RM	VP	CITRATO	TSI	LIA	UREA	BACTERIAS IDENTIFICADAS
1	-	-	+	-	A/A	A/A	+	<i>Arthrobacter</i>
2	-	-	+	-	K/A	K/K	+	<i>Alcaligenes Sp.</i>
3	-	+	-	+	K/A	K/K	+	<i>Alcaligenes Sp.</i>

ANEXO 4. Pruebas Bioquímicas de diferenciación en Bacterias de hierro ⁺³

COLONIAS	INDOL	RM	VP	CITRATO	TSI	LIA	UREA	BACTERIAS IDENTIFICADAS
1	-	+	-	+	K/A	K/K	+	<i>Alcaligenes Sp</i>
2	-	+	-	-	A/A	K/K	+	<i>Enterococcus</i>
3	-	+	-	+	K/A	K/K	+	<i>Alcaligenes Sp</i>

ANEXO 5. Fotos



Figura 3. Adicionando glucosa a los reactores

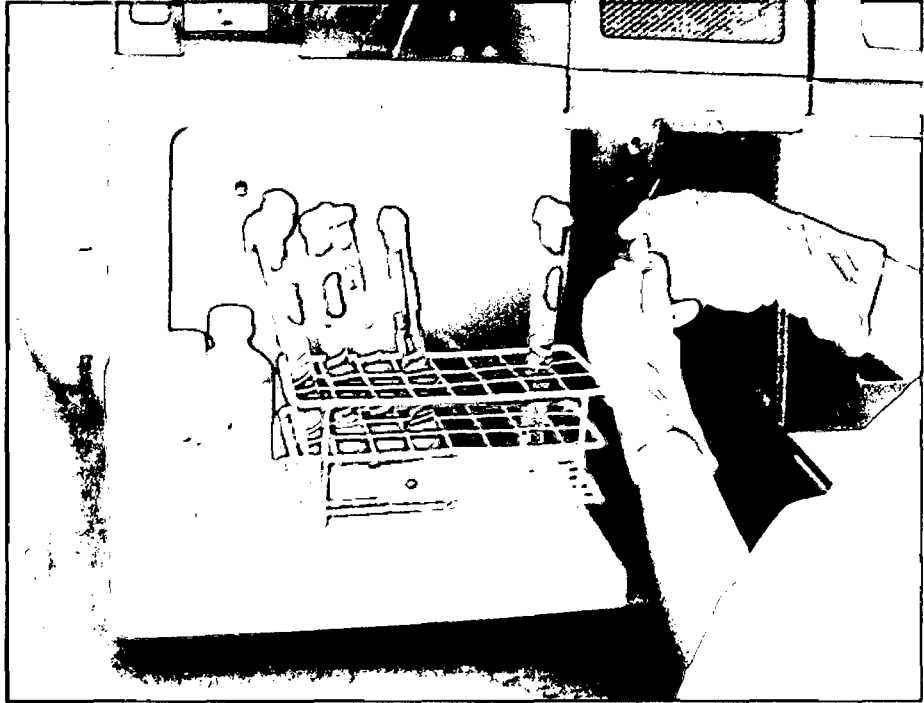


Figura 4. Lecturas en espectrofotómetro de absorción atómica



Figura 5. Personas reciclando basura.

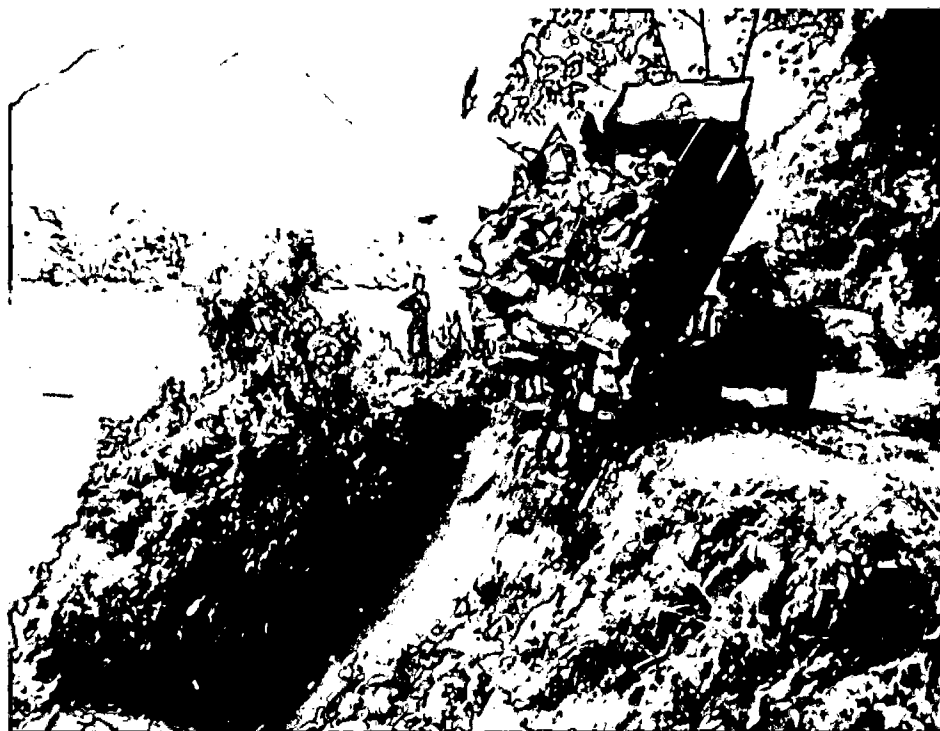


Figura 6. Volquetes botando basura al sector La Muyuna.