

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**



**“BIORREMEDIACIÓN DE AGUA CON NITRITOS MEDIADA POR  
*AZOTOBACTER SPP.* EN BIORREACTORES AIR LIFT”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES MENCIÓN  
CONSERVACIÓN DE SUELOS Y AGUA**

**Presentado por:**

**JANETH MARIBEL DIAZ PAREDES**

**2015**

## ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Los nitritos y nitratos.....	4
2.1.1. Propiedades fisicoquímicas de los nitritos.....	4
2.1.2. Propiedades fisicoquímicas del nitrato.....	5
2.1.3. Usos del nitrito y nitrato.....	5
2.2. Ciclo del nitrógeno.....	6
2.3. La eutrofización.....	7
2.4. Efecto del nitrito.....	8
2.4.1. Efectos en el suelo.....	8
2.4.2. Efectos en el agua.....	8
2.4.3. Efectos sobre las plantas.....	9
2.4.4. Efectos en la salud.....	9
2.5. Estándar de calidad del agua (ECA – agua).....	11
2.6. Depuración de nitritos.....	13
2.6.1. Floculación.....	13
2.6.2. Filtración.....	13
2.6.3. Procesos de membrana.....	14
2.6.4. Adsorción.....	15

2.7. Técnicas de estudio de la diversidad de poblaciones microbianas.....	16
2.7.1. Metodologías dependientes de cultivo.....	17
2.7.2. Las poblaciones microbianas.....	18
2.8. Biorremediación.....	20
2.9. Degradación biológica de nitritos.....	24
2.9.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	24
2.10. Biorreactores tipo air lift.....	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1. Lugar de ejecución.....	28
3.2. Materiales.....	28
3.2.1. Químicos.....	28
3.2.2. Unidades de estudio.....	29
3.2.3. Bacteria azotobacter.....	29
3.2.3.1. Asilamiento y selección de bacterias.....	29
3.2.3.2. Conservación de cepas bacterianas.....	30
3.3. Construcción de los biorreactores air lift.....	30
3.4. Operación en biorreactores de los cultivos.....	31
3.4.1. Preparación del inóculo.....	31
3.4.2. Proceso de operación de los cultivos para la biodegradación.....	31
3.5. Datos registrados.....	32
3.5.1. Oxígeno disuelto.....	32
3.5.2. Concentración y densidad celular bacteriana.....	32

3.5.3. Temperatura.....	32
3.5.4. Determinación del Ph.....	32
3.5.5. Determinación de nitratos y nitritos.....	33
3.5.6. Eficiencia de biodegradación.....	33
3.6. Diseño experimental.....	33
3.6.1. Tratamientos en estudio.....	34
3.6.2. Variables.....	35
3.7. Análisis estadísticos.....	35
3.7.1. Prueba de múltiple rangos de diferencia francamente significativa de Tukey.....	36
IV. RESULTADOS.....	37
4.1. Aislamiento de azotobacter.....	37
4.2. Operación en biorreactores.....	37
4.2.1. Concentración de biomasa.....	38
4.2.2. Concentración de nitritos.....	40
4.2.3. Oxígeno disuelto.....	43
4.2.4. Temperatura.....	45
4.2.5. Determinación del pH.....	47
V. DISCUSIÓN.....	49
VI. CONCLUSIONES.....	52
VII. RECOMENDACIONES.....	53
VIII. ABSTRACT.....	54
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	60

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Estándares nacionales de calidad ambiental para agua, según categoría 3.....	12
2. Composición de los tratamientos del estudio.....	34
3. Análisis de varianza.....	35
4. Condiciones de operación de los biorreactores air lift con <i>Azotobacter sp.</i> .....	38
5. Promedios de la concentración de azotobacter.....	39
6. Prueba de Tukey para concentración celular (mg/mL).....	39
7. Promedios de la concentración de nitrito degradado al inicio y al final de la operación de la biodegradación por <i>Azotobacter sp.</i> .....	40
8. Prueba de Tukey para la concentración final de las concentraciones de nitritos degradados.....	41
9. Promedios del consumo de oxígeno (OD) al inicio, a 7 días y al final de la operación.....	43
10. Prueba de Tukey para oxígeno disuelto final en los biorreactores air lift.....	44
11. Promedios de la temperatura al inicio, a 7 días y al final de la operación de degradación de nitritos por azotobacter.....	45
12. Prueba de Tukey para temperatura final en los biorreactores air lift.....	46

13. Promedios del pH al inicio, a 7 días y al final de la operación de degradación de nitritos por azotobacter.....	47
14. Prueba de Tukey para el pH al final de la operación en los biorreactores air lift.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.	Página
1. Ciclo del nitrógeno.....	6
2. Variación de la biomasa en las diferentes concentraciones de NO <sub>2</sub> .....	40
3. Variación de concentración de nitrito al final de la operación con los biorreactores.....	42
4. Variación de oxígeno disuelto.....	44
5. Variación de temperaturas de los tratamientos Con concentraciones de nitritos.....	46
6. Variación de de pH para las diferentes concentraciones de nitritos.....	48
7. Desinfección/esterilización de los biorreactores air lift.....	61
8. Pesando el suelo para el aislamiento de microorganismos.....	61
9. Filtrando el suelo para realizar las diluciones.....	62
10. Pipeteando los diluyentes para el aislamiento de microorganismos del suelo.....	62
11. Aislamiento de microorganismos en placas.....	63
12. Crecimiento de microorganismos en el medio M77.....	63
13. Crecimiento de microorganismos aislados.....	64
14. Microorganismos desarrollados en la placa.....	64

15. Biorreactores con el medio de cultivo y el inóculo en operación.....	65
16. Obtención de los efluentes para mediciones de pH, OD, biomasa.....	65
17. Medición de oxígeno disuelto.....	66
18. Medición en espectrofotómetro de la eficiencia de biorremediación del nitrito.....	66
19. Plaqueo de las muestras con los microorganismos asilados.....	67
20. Conteo de microorganismos.....	67

## DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía, iluminar mi camino y fortalecerme para vencer los obstáculos y permitir el logro de mi mayor anhelo.

A mis padres

Maribel Paredes C. y Agustín Díaz D.

por su gran amor, ser mi apoyo incondicional e inculcarme los valores que guían mi existencia.

A mis queridos abuelos Tomasa

Choque, Oscar Paredes, por

brindarme sus sabios consejos,

ánimo, fe y su gran cariño.

A mis padrinos Martha Choque,

Heriberto Campos, también a mis tíos,

tías, tíos, primos y primas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva por la formación académica profesional que me brindó en sus aulas.

Al Ing. MSc. Sandro Ruiz Castre por su asesoramiento del presente trabajo y verdadera amistad demostrada a lo largo de mi formación académica.

Al Dr. Mtblgo. César Samuel López López por su amistad y valioso apoyo que complementó mi formación académica profesional.

A los docentes de la Facultad de Recursos Naturales Renovables que se esforzaron por brindarme sus conocimientos y experiencia a través de las aulas universitarias.

A mis señores padres Maribel Paredes y Agustín Díaz, que con su gran amor siempre estuvieron apoyándome incondicionalmente.

Al Ing. Richard Sías Rodríguez, por su amistad y colaboración para poder realizar el presente trabajo.

A mis colegas y amigas (os) Maribel Roca, Lucy Saavedra, Víctor Beteta, Evelyn Huaman, Jolene Angulo, Solanger López, Imer Chang y a todos mis amigos con quienes pasé buenos momentos en las aulas universitarias.

A Jimmy Saldaña, por su gran apoyo y comprensión en la ejecución de este trabajo de investigación.

A todas las personas que de alguna manera influyeron en mi formación profesional y en la realización de este trabajo de investigación.

## RESUMEN

La presencia de nitritos en los cultivos agrícolas como consecuencia del uso de compuestos químicos, originan contaminación en los cuerpos aguas donde en última instancia el agua estancada de los cultivos drena hacia los cuerpos de agua. El *Azotobacter sp.*, es una bacteria nitrificante no simbiótica, que se utilizó como agente biorremediante al degradar concentraciones de nitrito ( $\text{NO}_2$ ). Las condiciones de operación de la degradación del nitrito se establecieron a 28 °C de temperatura externa, pH 6.43 a 9.10, 7 días de tiempo de retención, 0.72 vvm de flujo de entrada de aire, 800 mL de volumen del biorreactor, en un área cultivo de 0.078 m<sup>2</sup>. Se comprobó que *Azotobacter sp.* es capaz de degradar concentraciones de nitrito de hasta 25 mg/L con una eficiencia del 84.06 % utilizando un inóculo de biomasa del 15 % del volumen de trabajo en biorreactores air lift de 1 litro de capacidad total, determinándose que a mayor inóculo de biomasa la eficiencia de degradación se incrementa, manteniéndose en todos los tratamientos efectuados similares comportamientos respecto a la concentración bacteriana desarrollada, temperatura, pH y oxígeno disuelto, según el ajuste estadístico realizado.

## I. INTRODUCCIÓN

Los residuos de los campos de cultivo originan contaminación acuática cuando llegan a los afluentes de agua que tienen curso a ríos principales, esto origina también una eutrofización ya sea de quebradas, riachuelos, lagos, etc. Este problema reviste importancia ya que en esas aguas que generalmente se estancan por el riego en los campos agrícolas contienen entre sus componentes químicos, al nitrito; este químico se origina por los plaguicidas que se aplican por ejemplo a los cultivos de arroz, aguas residuales de granjas, avícolas, etc.; las concentraciones de nitrito obtenida de estos lugares sobrepasan los estándares de calidad ambiental (ECAs), representando un grave riesgo para esos ecosistemas acuáticos.

La concentración elevada de nitrito que llega a los cuerpos de agua como ríos o quebradas, puede en algunos casos ser consumida por poblaciones asentadas en las cercanías, ocasionando que sus integrantes sean vulnerables a enfermedades, puesto que el nitrito es tóxico al ser capaz de unirse a la hemoglobina de la sangre, intoxicación que puede ser mortal, o poder ser ingerido con alimentos preparados incluso ocasionando irritación en la piel.

La biorremediación es una tecnología que utiliza organismos vivos (vegetales, algas, hongos y bacterias) para adsorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en suelo, agua o aire. La aplicación de estas técnicas en campos de cultivo inundados, con altas concentraciones de nitrito, solucionarían oportunamente los posibles riesgos de contaminación e intoxicación.

Para ello, se determinará la efectividad de un tratamiento en donde la bacteria *Azotobacter spp.* actúe como agente biorremediante eliminando las concentraciones de nitritos por encima de lo establecido; por lo que se plantea la interrogante siguiente: ¿*Azotobacter spp.* cómo agente biorremediante, degradará el nitrito presente en el agua residual de cultivos del fundo de Agronomía en Tingo María, en biorreactores aireados tipo air lift?; teniendo como hipótesis que: *Azotobacter spp.* biodegrada los nitritos a niveles por debajo de los especificados en los Estándares de Calidad Ambiental para el agua de uso agrícola categoría 3 (Riego de Vegetales Bebidas de Animales) según el ECA – agua. (D. S. N° 003-2010-MINAM).

Se plantearon los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

Biorremediar agua con nitritos utilizando *Azotobacter spp.* en biorreactores aireados tipo air lift.

**Objetivos específicos**

- Aislar *Azotobacter spp.* a partir del suelo fijador de nitrógeno con capacidad degradadora de nitritos.
- Determinar la concentración de nitritos degradada por *Azotobacter spp.* como agente biorremediante en biorreactores air lift.
- Determinar la eficiencia del *Azotobacter spp.* en la biodegradación de nitritos del agua residual de cultivos.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Los nitritos y nitratos

#### 2.1.1. Propiedades fisicoquímicas de los nitritos

Los iones nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) son aniones inorgánicos de origen natural que forman parte del ciclo del nitrógeno.

Los nitritos (sales del ácido nitroso,  $\text{HNO}_2$ ) son solubles en agua y, por lo general, más estables que el ácido del que provienen. Se forman naturalmente a partir de los nitratos, ya sea por oxidación bacteriana incompleta del nitrógeno en los sistemas acuáticos y terrestres o por reducción bacteriana.

El ion nitrito es menos estable que el ion nitrato, es muy reactivo y puede actuar como agente oxidante y reductor, por lo que sólo se encuentra en cantidades apreciables en condiciones de baja oxigenación. Esta es la causa de que los nitritos se transformen rápidamente para dar nitratos, y de que, en general, estos últimos predominen en las aguas, tanto superficiales como subterráneas, así como en el ambiente (ONGLEY. E. D, 1997). Esta reacción de oxidación se puede efectuar en los sistemas biológicos y por factores abióticos.

### **2.1.2. Propiedades fisicoquímicas del nitrato**

En general los nitratos (sales del ácido nítrico,  $\text{HNO}_3$ ) son muy solubles en agua debido a la polaridad del ion; la estructura de éste es plana y de alta estabilidad, con el nitrógeno en el centro y los oxígenos en las esquinas de un triángulo equilátero y, en ella, cada uno de los enlaces N-O es un híbrido de un enlace sencillo y uno doble. Esta es la forma del nitrógeno más estable termodinámicamente en presencia de oxígeno, por lo que, en los sistemas acuáticos y terrestres, los materiales nitrogenados tienden a transformarse en nitratos (ONGLEY. E. D, 1997).

### **2.1.3. Usos del nitrito y nitrato**

El uso de nitratos y nitritos está autorizado en la UE únicamente en productos cárnicos, algunos quesos y en dos productos de la pesca: el arenque escabechado y el espadín escabechado.

Los nitritos y los nitratos se usan como conservantes de alimentos, pero solo el nitrito tiene una función antimicrobiana. De hecho, el nitrato se adiciona en el producto porque actúa como reserva de nitrito (ONGLEY. E. D, 1997). En los productos cárnicos los nitritos también tienen una función antioxidante y colorante (color rojizo característico).

## 2.2. Ciclo del nitrógeno

En este ciclo, los desechos que contienen nitrógeno orgánico se descomponen en el suelo o el agua, por acción de los microorganismos, para formar amoniaco en primera instancia. Posteriormente, éste se oxida para formar iones nitrito y éstos, a su vez, para dar nitratos. Los organismos superiores, incluyendo al hombre, no pueden aprovechar directamente el nitrógeno del aire, que es esencial para la vida, y requieren de la intervención de los microorganismos fijadores de nitrógeno, que lo pueden captar de la atmosfera y combinarlo enzimáticamente, para formar compuestos orgánicos, (TORTORA, G., FUNKE, B., CASE, C., 2007).

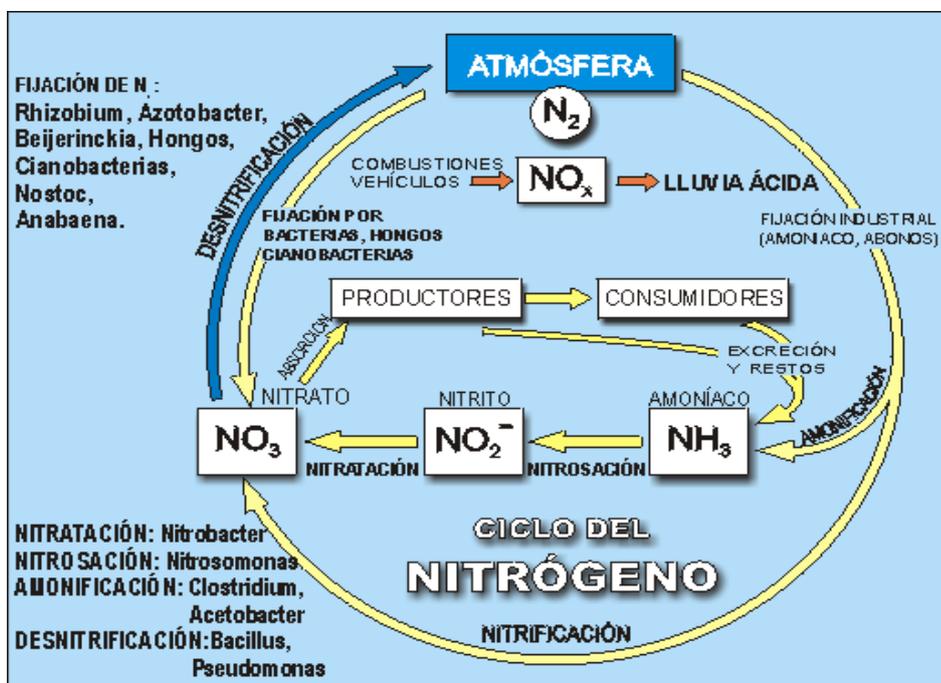


Figura 1. Ciclo del nitrógeno.

### 2.3. La eutrofización

La eutrofización es un tipo de contaminación química de las aguas. Se da cuando hay un aporte excesivo de nutrientes a un ecosistema acuático, el cual queda severamente afectado por ello. Puede producirse de forma natural (mareas rojas) pero es la antropogénica la que más debe preocuparnos. El fósforo y el nitrógeno son los principales causantes de la eutrofización aunque también es relevante cualquier otra sustancia que pueda ser limitante para el desarrollo de las diferentes especies como el potasio, el magnesio y diferentes productos orgánicos, (ONGLEY. E. D, 1997).

También puede considerarse de un modo más general que también afecta a suelos que han sufrido un enriquecimiento anormal de nitrógeno y en los que hay una tendencia al crecimiento de plantas afines a la abundancia de nutrientes inorgánicos, principalmente nitrógeno. No obstante, en la eutrofización antropogénica de las aguas. Explicando cómo y dónde se produce y los problemas que ocasiona, así como en que puede hacerse para combatirla o mitigarla aunque es conveniente tener en cuenta que ambas pueden estar bastante relacionadas al afectar los efluentes de un terreno con exceso de nutrientes a los cauces de agua a los que vierta sus aguas ese terreno. La eutrofización altera las características del medio ambiente de los ecosistemas acuáticos alterando la cadena trófica y aumentando la entropía (el desorden) del ecosistema. El resultado son ecosistemas con una biodiversidad reducida, con las especies oportunistas ocupando nichos previamente

ocupados por otras especies. Las consecuencias ecológicas son evidentes pero como suele suceder van de la mano de pérdidas económicas por distintos motivos, (ONGLEY. E. D, 1997).

## **2.4. Efectos del nitrito**

### **2.4.1. Efectos en el suelo**

Podría deberse a una contaminación externa (un río contaminado) o quizá al uso indebido y/o desmedido de fertilizantes. Podrían haber otros factores más raros como: la permeabilidad del suelo, la composición del mismo, la textura del suelo (el tamaño de sus partículas, la presencia de organismos antagónicos a las BFN respectivos, etc).

### **2.4.2. Efecto en el agua**

Los nitratos aparecen en el agua potable a causa de fugas o filtraciones procedentes de granjas, campos de golf, zonas de césped y jardines, que llegan al agua subterránea. Los nitratos y nitritos también pueden aparecer en el agua a causa de la cercanía de vertederos municipales, centros de cría de animales mal gestionados o sistemas sépticos defectuosos. Si posee un pozo privado, la aparición de nitratos en el agua puede ocurrir más fácilmente si el pozo está mal construido o ubicado (ONGLEY. E. D, 1997).

### **2.4.3. Efectos sobre las plantas**

El exceso de nitritos puede provocar un crecimiento excesivo de las plantas, que al crecer a un ritmo más elevado del normal, no tienen la fuerza ni la salud suficiente para hacer frente a las plagas. Por tanto uno de los peores efectos sería la propensión a enfermedades, al estar la planta debilitada (ONGLEY. E. D, 1997). Otro efecto es que el exceso de nitritos provoca algún tipo de reacción química en la planta que atrae a los pulgones enormes.

### **2.4.4. Efectos en la salud**

#### **2.4.4.1. Según la vía de exposición**

- Inhalación: Los poppers se descubrieron a mediados del siglo XIX. Se incluyen en esta familia de compuestos el nitrito isobutílico, el nitrito amílico y el nitrito butílico llano. Se inhalaban directamente de la botella para activar los efectos de otras drogas. El uso extenso puede dañar la nariz y los pulmones. Algunas personas pueden experimentar dolores de cabeza, sensaciones de mareo o de caída, así como la pérdida de la erección. Los poppers poseen un riesgo extra para las gentes que cuentan con sistemas inmunes suprimidos, problemas cardiacos, presión sanguínea alta o baja, una historia de hemorragias cerebrales, anemia, o en caso de embarazo (Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria, 2006).

- Ingestión: El nitrito es tóxico (2 g pueden causar la muerte de una persona), al ser capaz de unirse a la hemoglobina de la sangre, de una forma semejante a como lo hace a la mioglobina de la carne, formándose metahemoglobina, un compuesto que ya no es capaz de transportar el oxígeno.

Esta intoxicación puede ser mortal, y de hecho se conocen varios casos fatales por ingestión de embutidos con cantidades muy altas de nitritos, producidas localmente por un mal mezclado del aditivo con los otros ingredientes durante su fabricación. Para evitar esto, se puede utilizar el nitrito ya mezclado previamente con sal.

Otro riesgo del uso de nitratos y nitritos es la formación de nitrosaminas, sustancias que son agentes cancerígenos. Existen dos posibilidades de formación de nitrosaminas: en el alimento o en el propio organismo. En el primer caso, el riesgo se limita a aquellos productos que se calientan mucho durante el cocinado (tocino, por ejemplo) o que son ricos en aminas nitrosables (pescado y productos fermentados). En el segundo caso se podrían formar nitrosaminas en las condiciones ambientales del estómago.

- Contacto con la piel: En contacto con la piel causa irritación y salpullido. Causa irritación, enrojecimiento y dolor. Puede ser absorbido a través de la piel causando envenenamiento sistémico, los síntomas pueden ser similares a los de la ingestión.

- Contacto con los ojos: Causa irritación, enrojecimiento y dolor.

#### **2.4.4.2. Según el grado de la exposición**

La exposición repetida a través de cualquier vía puede causar síntomas similares a la toxicidad aguda.

#### **2.5. Estándar de calidad del agua (ECA – agua)**

Según los Estándares de Calidad Ambiental para el Agua la categoría designada para los valores de nitrito es 0.06 mg/L y nitrato es 10 mg/L. La categoría N° 3 (Riego de vegetales y bebida de animales).

Cuadro 1. Estándares nacionales de calidad ambiental para agua, según categoría 3.

PARÁMETROS	UNIDAD	VALOR
<b>Fisicoquímico</b>		
Bicarbonatos	mg/L	370
Calcio	mg/L	200
Carbonatos	mg/L	5
Cloruros	mg/L	100-700
Conductividad	(uS/cm)	<2,000
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	15
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	40
Fluoruros	mg/L	1
Fosfatos - P	mg/L	1
Nitratos (NO <sub>3</sub> -N)	mg/L	10
Nitritos (NO <sub>2</sub> -N)	mg/L	0.06
Oxígeno disuelto	mg/L	>=4
pH	Unidad de pH	6.5 - 8.5
Sodio	mg/L	200
Sulfatos	mg/L	300
Sulfuros	mg/L	0.05
<b>Inorgánicos</b>		
Aluminio	mg/L	5
Arsénico	mg/L	0.05
Bario total	mg/L	0.7
Boro	mg/L	0.5-6
Cadmio	mg/L	0.005
Cianuro Wad	mg/L	0.1
Cobalto	mg/L	0.05
Cobre	mg/L	0.2
Cromo (6+)	mg/L	0.1
Hierro	mg/L	1
Litio	mg/L	2.5
Magnesio	mg/L	150
Manganeso	mg/L	0.2
Mercurio	mg/L	0.001
Niquel	mg/L	0.2
Plata	mg/L	0.05
Plomo	mg/L	0.05
Selenio	mg/L	0.05
Zinc	mg/L	2

Fuente: D. S. MINAM, 2010.

## **2.6. Depuración de nitritos**

### **2.6.1. Floculación**

En el proceso convencional de coagulación-floculación-sedimentación, se añade un coagulante al agua fuente para crear una atracción entre las partículas en suspensión. La mezcla se agita lentamente para inducir la agrupación de partículas entre sí para formar “flóculos”. El agua se traslada entonces a un depósito tranquilo de sedimentación para sedimentar los sólidos. Un coagulante para flocular las partículas en suspensión; pero en vez de usar la sedimentación, burbujas de aire presurizado las empujan hacia la superficie del agua desde donde se pueden extraer. Se ha desarrollado un sistema de floculación-cloración como tecnología de punto de uso, especialmente para países en vías de desarrollo. Éste usa paquetes pequeños de productos químicos y equipos sencillos como cubetas y un filtro de paño para purificar el agua.

Finalmente, el ablandamiento de cal es una tecnología utilizada por lo general para “ablandar” el agua, es decir, eliminar las sales minerales de calcio y magnesio. En este caso, el material que se decanta no es el sedimento en suspensión sino las sales disueltas.

### **2.6.2. Filtración**

Los sistemas de filtración tratan el agua pasándola a través de lechos de materiales granulares (p.ej., arena) que retiran y retienen los

contaminantes. Los sistemas de filtrado convencionales, directos, lentos de arena y de tierra diatomácea hacen todos un buen trabajo al eliminar la mayoría de protozoos, bacterias y virus (si se usa la coagulación). Usualmente, los filtros de bolsa y cartucho no eliminan los virus y muy pocas bacterias.

La filtración convencional es una operación de varias etapas. Primero, se agrega un coagulante químico como sales de hierro o de aluminio al agua fuente. Después, se agita la mezcla para inducir la unión de las partículas pequeñas en suspensión para formar grumos más grandes o “flóculos” más fáciles de retirar. Estas masas coaguladas, o “flóculos”, se dejan asentar fuera del agua, para que se lleven consigo muchos contaminantes. Al terminar estos procesos, el agua se pasa a través de filtros de manera que las partículas restantes se adhieran por sí mismas al material de filtro.

La filtración directa es similar a la filtración convencional, excepto que después de agregar el coagulante, y después de agitar la mezcla, no hay una fase separada para la sedimentación. En vez de ello, las partículas en suspensión son desestabilizadas por el coagulante y así se adhieren con mayor facilidad al material de filtro cuando el agua se filtra posteriormente.

### **2.6.3. Procesos de membrana**

Originalmente se usaron únicamente en proyectos de desalinización. Pero las mejoras en la tecnología de membranas los ha

convertido en una opción cada vez más popular para la eliminación de microorganismos, particulados y materiales orgánicos naturales que afectan el sabor del agua y enturbian su claridad.

Las membranas para el tratamiento del agua son láminas delgadas de material que permiten separar los contaminantes según sus características como el tamaño o la carga eléctrica. El agua pasa a través de una membrana; pero dependiendo de su tamaño, las partículas de mayor tamaño, los microorganismos y otros contaminantes quedan separados. Algunos de estos sistemas son accionados a presión, dependiendo de la presión del agua para separar las partículas según su tamaño. La microfiltración utiliza el mayor tamaño de poro, y puede eliminar arena, limos, arcillas, algas, bacterias, *Giardia* y *Cryptosporidium*. La ultrafiltración puede además eliminar virus. Los sistemas de nanofiltración proporcionan protección casi completa contra virus, eliminan la mayoría de contaminantes orgánicos, y pueden reducir la dureza del agua. Los sistemas de ósmosis inversa son membranas densas que eliminan casi todos los contaminantes inorgánicos y casi todo excepto las moléculas orgánicas de menor tamaño.

#### **2.6.4. Adsorción**

Los sistemas de adsorción tratan el agua mediante la adición de una sustancia, como carbón activado o alúmina (óxido de aluminio), a la fuente de suministro de agua. Los adsorbentes atraen a los contaminantes mediante

procesos químicos y físicos que causan que éstos se ‘adhieran’ a sus superficies para su eliminación posterior. Por un gran margen, el adsorbente de uso más frecuente es el carbón activado una sustancia similar al carbón común pero sumamente porosa. El carbón activado en polvo a menudo se usa cuando surgen problemas temporales de calidad; éste se puede agregar sencillamente al agua y desecharlo con los fangos de desecho. El carbón granular activado a menudo se distribuye en una bandeja a través de la cual se hace pasar o percolar lentamente el agua fuente.

## **2.7. Técnicas de estudio de la diversidad de poblaciones microbianas**

Durante el último siglo, y especialmente en los últimos 20 años se ha incrementado muy significativamente las metodologías para estudiar la diversidad microbiana existente en la biosfera. En realidad, estudios elaborados por TORSVIK *et al.*, (1990 y 2003) sugieren que existen unos 4000 equivalentes genómicos distintos por gramo de suelo, lo que indica que quizá existan 1000 o incluso más especies microbianas diferentes por gramo de suelo.

Esta gran diversidad encontrada por TORSVIK (1990) también estaría en concordancia con un estudio de TRUPER (1992) donde se estima que podrían existir un total de  $3 \cdot 10^4$  especies bacterianas diferentes en la biosfera. Otro punto a tener en cuenta es que tan sólo entre un 0.001 y un 1% de los microorganismos viables son realmente cultivables.

### 2.7.1. Metodologías dependientes de cultivo

Son técnicas que requieren el cultivo de los microorganismos para la caracterización de la diversidad de una comunidad microbiana. Entre ellas encontramos las técnicas clásicas de cultivo en placa en medios sintéticos de laboratorio y el número más probable. Más recientemente se ha utilizado el Biolog<sup>TM</sup>, una técnica que se utiliza para el estudio de las comunidades microbianas en base a un perfil fisiológico, y que consiste en inocular muestras ambientales en cada uno de los 96 pocillos que contiene una placa Biolog<sup>TM</sup> cuyo contenido se basa en distintos medios y sustratos. La comparación entre perfiles fisiológicos de una comunidad o de diferentes muestras ambientales se calcula estadísticamente.

El principal inconveniente es que solamente se aísla una pequeña proporción de los componentes existentes en la comunidad microbiana, ya que los medios sintéticos de laboratorio y el soporte (sólido o líquido) limitan la proporción de microorganismos aislados (TORSVIK *et al.*, 2003). Las técnicas cultivo-dependientes tienen una serie de ventajas e inconvenientes para el estudio de la diversidad microbiana.

Las ventajas más importantes consisten en la obtención de cultivos puros, útiles para estudios posteriores, y de información acerca de actividades metabólicas de interés.

### 2.7.2. Las poblaciones microbianas

La red de poros formada como resultado de la asociación de las partículas minerales (arenas, limos y arcillas) y la materia orgánica, muestra una gran variedad de tamaños y espacios, lo que condiciona el tipo y la diversidad de las poblaciones microbianas existentes. En términos generales se encuentran del orden de  $10^6$ - $10^9$  bacterias cultivables por gramo de suelo, mientras que los hongos se encuentran en dos órdenes de magnitud menos como unidades formadoras de colonias, pero representan una parte importante de la biomasa del suelo (ALEXANDER, 1999).

Sin embargo, la estructura de la población microbiana en los microhábitats (poros) del suelo, aún sigue siendo poco conocida, y además se estima que tan solo un 0,1-1% de los microorganismos son cultivables (AMANN *et al.*, 1995). La organización estructural de las partículas del suelo, confiere una heterogeneidad espacial para los microorganismos, que se caracteriza por la presencia de diferentes sustratos, nutrientes, concentraciones de oxígeno, contenido de agua líquida, así como de un pH variable (LADD *et al.*, 1996).

Este hecho implica que en un suelo se puedan encontrar una gran variedad de poblaciones microbianas con capacidades metabólicas distintas, condicionadas también por la biodisponibilidad de las distintas fuentes de carbono y energía, que a su vez está condicionada por las características fisicoquímicas propias de cada suelo.

La capacidad metabólica de las poblaciones microbianas, frente a los contaminantes presentes en un suelo, es el fundamento sobre el que se sustenta la tecnología de la biorremediación (ALEXANDER, 1999). Generalmente, en un suelo con contaminación recurrente o con episodios previos de contaminación, las poblaciones microbianas autóctonas se habrán seleccionado en favor de la metabolización del contaminante, el cual puede ser transformado con mayor rapidez que la materia orgánica húmica del suelo.

Por este motivo, en emplazamientos previamente contaminados, la bioestimulación de la población microbiana indígena, puede acelerar el proceso de biodegradación de los contaminantes, siempre y cuando los compuestos no sean de gran recalcitrancia (ALEXANDER, 1999). Únicamente en aquellos casos de contaminación puntual o de compuestos de gran recalcitrancia, puede ser necesaria la inoculación de poblaciones alóctonas, procedentes de cultivos de laboratorio con capacidades degradativas especializadas, para posibilitar la degradación de los contaminantes existentes. Sin embargo, a menudo la falta de adaptación de las poblaciones exógenas, puede poner en peligro su supervivencia.

Por lo tanto, antes de iniciar cualquier estudio de biorremediación, es esencial conocer si la población microbiana existente en el suelo es potencialmente degradadora de los contaminantes presentes y es suficiente para llevar a cabo el proceso de biodegradación en un tiempo razonable (WRENN y VENOSA, 1996).

## 2.8. Biorremediación

Las prácticas de biorremediación consisten en el uso de microorganismos como plantas, hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o convirtiéndolas en inocuas para el ambiente y la salud humana. La biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto xenobiótico. La fitorremediación, es el uso de plantas para la remoción de contaminantes de suelo y aguas, es una técnica apropiada para la remoción de metales pesados y radionucleos. Las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, aunque también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, Cianobacterias y Actinomicetes para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo (SCHMIDT, 2000)

La biorremediación del suelo, puede ser dividida en estrategias in situ y ex situ. In situ corresponde a la biorremediación referente a tratamientos que no requieren excavación del suelo contaminado; ex situ es un método donde se excava el suelo o el material a tratar y se le maneja en un sistema controlado como una celda de landfarming o algún tipo de biorreactor (EBRU, .2004)

La reintroducción de microorganismos aislados de un sitio contaminado ayuda a resolver este problema ya que los microorganismos

pueden degradar los constituyentes y tiene una gran tolerancia a la toxicidad (DRYIDALE *et al.*, 1999). Los métodos mas empleados en biorremediación son:

Biofiltración, en esta entra el aire contaminado a unos biorreactores en los cuales la flora microbiana degrada los contaminantes volátiles en dióxido de carbono, agua y biomasa.

Bioventing, es un proceso de biorremediación in situ que consiste en la ventilación forzada del suelo mediante la inyección de O<sub>2</sub> en la zona no saturada mediante pozos de inyección; debido a la aireación se va a favorecer la degradación de los hidrocarburos por volatilización y migración de la fase más volátil del contaminante, y por biodegradación, ya que al incrementar la oxigenación del suelo se va a estimular la actividad microbiana (ULLA *et al.*, 2002).

El Biosparging, es un método in situ que combina el efecto de la ventilación con la utilización de los microorganismos autóctonos para degradar compuestos orgánicos absorbidos por el suelo en la zona saturada.

Las técnicas de recuperación para acuíferos contaminados más empleadas son el bombeo de agua contaminada y posterior tratamiento en superficie, inyección de soluciones acuosas con reactivos e inyección de aire

para eliminar sustancias volátiles y el uso de microorganismos para transformar y degradar el contaminante (LEE *et al.*, 2001).

El *Rhododoccus* posee una gran variedad de vías metabólicas para la degradación y modificación de compuestos aromáticos. Algunas cepas presentan también la vía del 3-oxoadipato. Lo anterior sumado a su capacidad de crecimiento en medios con escasos nutrientes, la carencia de un sistema de represión catabólica y su persistencia ambiental las hacen excelentes candidatas para los tratamientos de biorremediación (FLAVIO *et al.*, 1999).

Las *Pseudomonas* son bacterias productoras de biosurfactantes como los ramnolipidos involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados, Bushnell y Hass fueron de los primeros en describir bacterias productoras de biosurfactantes, como el *Corynebacterium simplex* y cepas de *Pseudomonas* (NELSON *et al.*, 2002).

La *Pseudomonas aeruginosa*, es otro de los microorganismos más usado y estudiado en biorremediación y presenta una serie de actividades naturales sobre xenobióticos. Lamentablemente, también es conocida por ser un patógeno oportunista en humanos y causante de complicaciones graves en personas inmunosuprimidas, con quemaduras severas o con fibrosis quística. Por estas razones existe mucho interés en el estudio de las relaciones filogenéticas entre serotipos clínicos y ambientales (ROCKNE *et al.*, 2002).

*Burkholderia*, es otro género bacteriano utilizado para biorremediación de herbicidas y pesticidas recalcitrantes y también es usado para proteger cultivos contra hongos. Debido a su genoma extremadamente flexible, *Burkholderia cepacia*, bacilo Gram negativo no fermentador, productora de pigmento amarillo tiene una gran capacidad mutagenica y adaptativa, ha sido recuperada a partir de agua y superficies húmedas, es resistente a múltiples antibióticos y ésta capacidad es altamente transmisible entre especies. Por todas estas razones, la selección de cepas .seguras. para su uso ambiental no es posible por el momento y su uso en la agricultura también debe ser cauteloso. Aunque es una excelente degradadora de los hidrocarburos aromáticos (SVENJA *et al.*, 1999).

Otro género estudiado dentro de las técnicas de biorremediación es *Sphingomonas*, bacilos no fermentadores y dentro de estos la *Sphingomona wittichi* es un microorganismo capaz de degradar en condiciones anaerobias el 2,7diclorobenceno, produciendo el metabolito 4 clorocatenol y el 1,2,3,4 tetraclorodibenceno (CHRISTOPHER *et al.*, 2004).

La persistencia de los PAHs en el ambiente se deben a factores como los nutrientes, la viabilidad, la temperatura, el oxígeno y la presencia de microorganismo degradadores y el mayor problema para la degradación de esto es la baja solubilidad en agua para poder implementar un sistema aeróbico (LÓPEZ *et al.*, 2000), por esto la degradación anaeróbica a bajas temperaturas ha sido estudiada como posible causa de una baja degradación

donde encontraron que las bajas temperaturas no afectan la población microbiana sino que la disponibilidad de oxígeno, siendo este el agente más limitante y que conducía a formación metabolitos tóxicos que inhibían el crecimiento bacteriano (SANJEET *et al.*, 2001).

## **2.9. Degradación biológica de nitritos**

### **2.9.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno**

Las bacterias fijadoras de nitrógeno que se desarrollan de forma natural en el suelo, se conocen desde hace más de un siglo. Representan un biofertilizante ecológico y se dividen en dos grandes grupos: Las simbióticas, específicas de las leguminosas, como el *Rhizobium*, y las libres, que viven en el suelo y no necesitan la planta para su reproducción, como el *Azotobacter* y el *Azospirillum*, entre los más importantes en agricultura (TORTORA, FUNKE, CASE, 2007).

El *Azotobacter* y el *Azospirillum*, en concentraciones adecuadas, pueden sustituir al nitrógeno químico (urea, amoníaco) sin merma de la producción y a menor coste. Otras ventajas comprobadas del uso de estas bacterias como biofertilizante son:

- Producen fitohormonas, como el ácido indolacético y las citoquininas, capaces de acelerar y potenciar el crecimiento de las plantas.

- Al permanecer vivas durante años y reproducirse en el suelo, no sólo no lo degradan sino que contribuyen a su enriquecimiento en nitrógeno y a su regeneración de forma ecológica y gradual, incluso en terrenos de alta concentración salina.
  
- Se ha comprobado que fertilizando los cultivos con estas bacterias y con nitrógeno químico en un porcentaje entre el 20 y 50 % del utilizado normalmente, se consigue un aumento de producción sobre las cosechas obtenidas únicamente con fertilizante químico al 100 %. Esto es debido a que, al liberarse la bacteria de su función fijadora de nitrógeno, produce más factores de crecimiento vegetal, en cereales de secano, esto puede suponer el ahorro del abonado de cobertera.
  
- Crea una barrera protectora contra hongos y bacterias patógenas en la raíz de la planta, por lo que ésta crece más sana y fortalecida.
  
- Producen enzimas que solubilizan los fosfatos y los hacen más accesibles a la planta, así como factores que facilitan la absorción de oligoelementos.
  
- Las nuevas estirpes de *Azotobacter* y *Azospirillum* son capaces de fijar un 72.64% más de nitrógeno atmosférico, que las estirpes originales. Hay pues un cúmulo de ventajas para el usuario, económicas, ecológicas, a corto, medio y largo plazo en la progresiva sustitución de la fertilización química por las bacterias naturales, totalmente inofensivas para el medio y el ser humano.

**Clasificación científica**

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Pseudomonadales
Familia	: Pseudomonadaceae
Género	: Azotobacter
Especies	: <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i>

**2.10. Biorreactores tipo *air lift***

Un biorreactor tipo air lift, consiste básicamente en una columna en cuyo interior se encuentra una fase líquida móvil que contiene al lecho filtrante en suspensión y una fase continua de reacción de gas o líquido (AGUAYO, 2005). Los biorreactores del tipo air lift han sido son extensamente utilizados para el tratamiento de agua; sin embargo, su aplicación al tratamiento de gases y xenobióticos ha sido escasamente desarrollada. Originalmente los biorreactores air lift se desarrollaron para el post tratamiento de aguas industriales tratadas anaeróbicamente, existiendo instalaciones a nivel industrial en funcionamiento (HEIJNEN et al., 2001).

Los biorreactores air lift ofrecen ciertas ventajas con respecto a las demás tecnologías de tratamiento biológico, como la incorporación de transferencia y biodegradación total en un solo recipiente del biorreactor y

además no presentan problemas de humedad, siendo el control de biomasa su única limitación (EDWARDS, et al., 2002).

Los biorreactores tipo air lift están constituidos por una cámara de cultivo cilíndrica de vidrio, tubo deflector o de distribución central y anexos frascos con solución saturada de NaCl como filtros para aire, la fuente de aeración es una bomba de aire (AIR PUMP JUNIOR) que proporcione al menos 1.0 L de aire/min (LOPEZ, 1997; MIRANDA et al., 2006).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología General, de la Facultad de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicado en la provincia de Leoncio Prado, distrito de 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 3,200 mm y humedad relativa de 82 % (estación meteorológica José Abelardo Quiñones, 2012).

#### **3.2. Materiales**

##### **3.2.1. Químicos**

Se utilizó el nitrito de potasio  $\text{KNO}_2$  ( $M_r$  : 85.10379;  $\rho$ :1.91  $\text{g/cm}^3$ ) en tres concentraciones (C1: 15 mg de  $\text{NO}_2/\text{m}^3$ , C2: 20 mg de  $\text{NO}_2/\text{m}^3$  y C3: 25 mg de  $\text{NO}_2/\text{m}^3$ ) adicionadas a las muestras de agua residuales de cultivo de arroz.

Las muestras de agua residual se recolectaron de terrenos agrícolas con cultivo de arroz con aguas estancadas, tomándose en recipientes esterilizados, que se trasladaron al laboratorio de microbiología.

### **3.2.2. Unidades de estudio**

Las unidades de estudio lo constituyeron los biorreactores air lift en donde se llevó a cabo la degradación de nitritos de las aguas residuales de cultivo adicionadas de diferentes concentraciones de nitrito, utilizando la bacteria *Azotobacter* como agente biorremediante.

### **3.2.3. *Azotobacter***

#### **3.2.3.1. Aislamiento y selección de bacterias**

Para aislar la bacteria se tomaron muestras de suelos agrícolas del fundo de la facultad de Agronomía en una cantidad no mayor de 250 g, las que se trasladaron al laboratorio, se las tamizó y se sometieron a 110 °C por 4 horas. Posteriormente se realizaron diluciones decimales de las muestras y de la última dilución ( $10^{-5}$ ) se procedió a la siembra en profundidad utilizando Medio Agar M77 - Manitol adicionado de Fluconazol (150 µg/mL) para determinar el recuento de *Azotobacter* en el suelo (LOPEZ, 2006), y asimismo se sembraron en superficie placas con el Medio según ASHBY (Ashby Manitol Agar) para proceder al aislamiento y selección de las colonias para su conservación posterior.

### **3.2.3.2. Conservación de cepas bacterianas**

Las colonias bacterianas desarrolladas sobre el medio de aislamiento, se repicaron en placas con medio Levadura Manitol Agar (YMA) adicionado con Fluconazol (150 µg/mL) y se incubaron a 35 °C por 18 a 24 horas, posteriormente se trasladaron a tubos de 15 x 150 mm con medio YMA semisólido y se mantuvieron en refrigeración (4 °C a 8 °C) (LOPEZ, 2006), hasta el inicio de la operación en los biorreactores.

### **3.3. Construcción de los biorreactores air lift**

Los biorreactores tipo air lift que se utilizó en este trabajo, se construyeron utilizando frascos de vidrio de 1,000 mL de capacidad, varillas de vidrio duro de 200 mm de largo, tubo hueco de 150 mm de largo por 75 mm de ancho, dos tubos huecos de 10 mm de diámetro por 100 mm de largo, material microporoso de 20 mm de espesor por 250 mm de diámetro; se adjuntó frascos con solución saturada de NaCl con filtros para aire.

La fuente de aireación fue una bomba de aire de pecera (AIR PUMP JUNIOR) la que proporcionó 1,100 mL aire/min, unos 0.72 vvm (volumen de líquido/volumen de aire/minuto). La cámara de cultivo y tubo deflector o de distribución de los biorreactores se esterilizaron al vapor de agua, utilizando el autoclave a 121 °C a 15 lbs/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos; y se esterilizaron por sumersión en solución alcohol-ácida al 1 % (etanol - HCl) los

accesorios del biorreactor como son la cubierta superior (material micro poroso), válvulas de control de entrada/salida de aire y conectores de flujo de aire (LOPEZ, 1998; MIRANDA et al., 2006).

### **3.4. Operación en biorreactores de los cultivos**

#### **3.4.1. Preparación del inóculo**

Las bacterias seleccionadas y conservadas, se cultivaron en matraces de 200 mL conteniendo 100 mL Medio Caldo Levadura Manitol (YMB) con Fluconazol (150 µg/mL), cultivos que permitieron la obtención de los inóculos de siembra. Estos inóculos fueron 5 %, 10 % y 15 % del volumen total (800 mL) del medio mínimo de sales minerales de Davis (MMSM) a utilizar en los biorreactores air lift.

#### **3.4.2. Proceso de operación de los cultivos para la biodegradación**

Se realizó en biorreactores tipo air lift por 7 días a temperatura ambiente. Se inició la operación al poner en funcionamiento la fuente de aireación con un filtro de una solución de ClNa al 20 %, para que el aire ingresante a los biorreactores sea estéril. Se tomaron datos al inicio de la operación, a la mitad y al final de la misma. Se repitieron las experiencias hasta en tres oportunidades por cada concentración.

### **3.5. Datos registrados**

#### **3.5.1. Oxígeno disuelto**

Se determinó la concentración de oxígeno con ayuda del Oxímetro HANNA (electrodo de membrana) poniendo el medidor en operación y sumergiendo el electrodo en las muestras. Los resultados se reportaron en mg/L (APHA, 1999).

#### **3.5.2. Concentración celular bacteriana**

El número celular bacteriana en los biorreactores, se determinó por la medida de la concentración celular, realizando recuentos directos, con diluciones, en Medio YMA adicionado con Fluconazol (150 µg/mL), expresándose los resultados en células por mililitro (cél/mL) (LÓPEZ, 1997).

#### **3.5.3. Temperatura**

La temperatura interna de operación se midió con los termómetros digitales ROAST introducidos a los biorreactores, la temperatura externa se determinó por un termómetro ambiental.

#### **3.5.4. Determinación del pH**

Se utilizó el pHmetro EXTECH debidamente calibrado para la determinación del pH (método N° 11.032 de la AOAC, 2000).

### 3.5.5. Determinación de nitratos y nitritos

Se utilizó la metodología y reactivos de HANNA HI 3874-0 para nitratos y reactivos HANNA HI 3873-0 para nitritos, luego se procedió hacer la lectura en el espectrofotómetro 410 nm para la cuantificación del nitrito y nitrato presentes en la muestra y efluente de los biorreactores.

### 3.5.6. Eficiencia de biodegradación

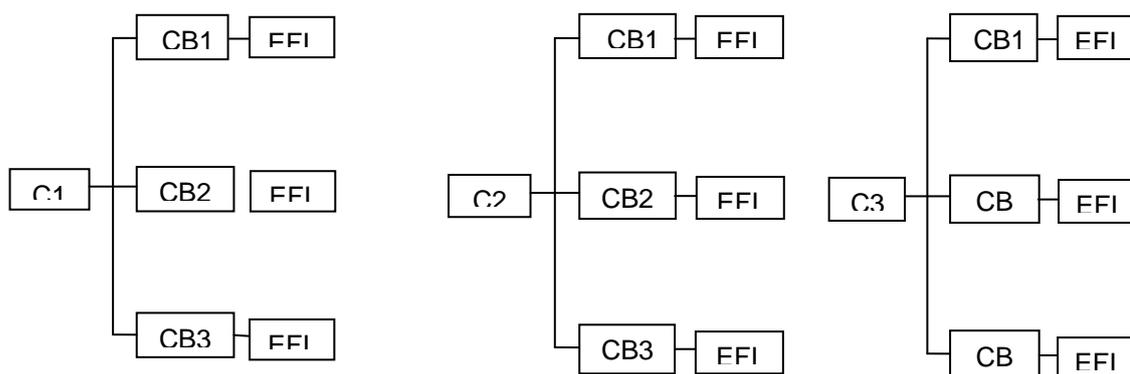
Se calculó mediante una correlación porcentual entre la concentración inicial y final de  $\text{NO}_2$  presente en cada biorreactor, según el tratamiento del mismo, mediante la siguiente fórmula:

$$E_{bd} = \left( \frac{C_i - C_f}{C_i} \right) * 100$$

Dónde: Ebd = eficiencia de biodegradación (%)  
Ci = Concentración inicial de  $\text{NO}_2$  (mg/m<sup>3</sup>)  
Cf = Concentración final de  $\text{NO}_2$  (mg/m<sup>3</sup>).

## 3.6. Diseño experimental

Se aplicó un diseño experimental con estímulo creciente, trabajándose con tres concentraciones de nitrito (C1: 15 mg/m<sup>3</sup>, C2: 20 mg/m<sup>3</sup> y C3: 25 mg/m<sup>3</sup>), con tres dosis de inóculo (CB1, CB2, CB3) y tres repeticiones, a fin de evaluar la eficiencia de biodegradación (EFI) y el consecuente incremento de la biomasa (BM), según el siguiente esquema:



Leyenda:

[C1]: Concentración inicial de  $\text{NO}_2$  (15 mg/L), [C2]: Concentración inicial de  $\text{NO}_2$  (20 mg/L), [C3] Concentración inicial de  $\text{NO}_2$  (25 mg/L), [CB1]: Carga bacteriana de 5%, [CB2]: Carga bacteriana de 10%, [CB3]: Carga bacteriana de 15%, [EFI]: Eficiencia de biodegradación

### 3.6.1. Tratamientos en estudio

Los tratamientos en estudio fueron los siguientes:

Cuadro 2. Composición de los tratamientos del estudio

Tratamiento	Concentración de $\text{NO}_2$ (mg/L)	Inoculo (% del volumen del medio en biorreactor)	Repeticiones
T1	15	5	3
T2	15	10	3
T3	15	15	3
T4	20	5	3
T5	20	10	3
T6	20	15	3
T7	25	5	3
T8	25	10	3
T9	25	15	3

### 3.6.2. Variables

#### Variable independiente

- Concentración de nitrito (C1, C2, C3).
- Inóculo (CB1, CB2, CB3).

#### Variable dependiente:

- Eficiencia de biodegradación (EFI).

### 3.7. Análisis estadístico

Se distribuyeron las variables estadísticas y tratamientos de acuerdo al diseño experimental se utilizó el modelo estadístico completamente al azar (DCA) con arreglo 3 x 3 x 2 con tres repeticiones, utilizando el paquete estadístico Statgraphics centurión XV.II en español, para un nivel de significación del 5%.

Cuadro 3. Análisis de varianza.

<b>Fuente de variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Signif</b>
Tratamientos	t – 1	ST- e	SCtrat/GLtrat	CMtrat/CMe	Fc > Ft
Error	t(r-1)	SCT-SCtrat	SCerror/GLe		
TOTAL	t.r-1				

### **3.7.1. Prueba de múltiple rangos de diferencia francamente significativa de Tukey (HSD Tukey)**

Se empleó la Diferencia Francamente Significativa de Tukey (HSD - Tukey) a fin de determinar entre que tratamientos había diferencias significativas, para un nivel de significación del 5%, utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV.II en español.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Aislamiento de *Azotobacter*

Aplicando la metodología descrita de la muestra de suelo se aisló la bacteria *Azotobacter*, conservándose las colonias bacterianas en medio YMA adicionado con Fluconazol (150 µg/mL), para posteriormente empezar con la operación en los biorreactores.

### 4.2. Operación en biorreactores

Los cultivos de *Azotobacter sp.* seleccionados se repicaron en Caldo Sabouraud del cual se prepararon los inóculos de 40 mL (5 %), 80 mL (10 %) y 120 mL (15 %) referidos al volumen total del medio en los biorreactores.

Se tuvo como parámetros de operación los que se indican en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones de operación de los biorreactores air lift con *Azotobacter sp.*

<b>Parámetros</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valores</b>
Área	m <sup>2</sup>	0.07854
Volumen	cm <sup>3</sup>	800
Flujo de aire	vvm	0.72
Aireación bomba	mL aire/min	1,100
Tiempo de retención	días	7
Reacción	pH	6.43 – 9.10
Temperatura externa	° C	27 - 28
Concentraciones de nitrito	mg/L	15 mg/L, 20 mg/L y 25 mg/L

#### 4.2.1. Concentración de biomasa

Los *Azotobacter sp.* desarrollados en los biorreactores evidenciaron incremento de biomasa en mayor cantidad sobre la concentración de NO<sub>2</sub> de 25 (mg/L) y en menor grado sobre la concentración de NO<sub>2</sub> de 15 (mg/L), tal como se muestran en los recuentos de concentración (Cuadro 5).

Cuadro 5. Promedios de la concentración de *Azotobacter sp.*

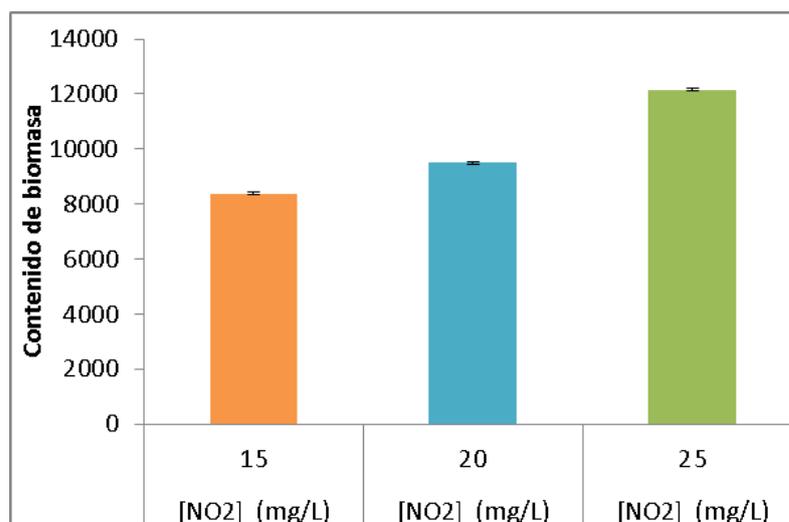
Concentración de NO <sub>2</sub> (mg/L)	Inoculo (% del volumen del medio en biorreactor)	BIOMASA		
		Concentración celular (x 10 <sup>6</sup> cél/mL)		
		Inicial	7 días	Final
15	5	4,480.00	6,840.00	10,189.00
15	10	4,953.00	7,560.00	11,554.00
15	15	7,002.00	9,033.00	13,824.00
20	5	5,327.00	7,194.00	11,588.00
20	10	5,576.00	7,985.00	13,223.00
20	15	8,899.00	9,432.00	16,370.00
25	5	7,112.00	8,178.00	15,799.00
25	10	9,554.00	8,648.00	16,024.00
25	15	9,846.00	14,066.00	20,188.00

Los resultados de la aplicación de la prueba de Tukey para medias de la densidad celular encontrada en el que podemos apreciar que no existen diferencias significativas para la concentración de NO<sub>2</sub> de 25 (mg/L) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Prueba de Tukey para concentración celular (mg/mL)

CONC. NO <sub>2</sub>	Medias	Grupos	Sig. para $\alpha = 0.05$
15	3,818.67	A	NS
20	9,510.44	A	NS
25	12,157.22	A	NS

*Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadística según prueba Tukey a 5% de nivel de significancia.*



**Figura 2.** Variación de la biomasa en las diferentes concentraciones de NO<sub>2</sub>.

Se puede observar que en las tres diferentes concentraciones de nitrito (figura 2), la biomasa aumenta a medida que aumenta la concentración de nitrito al 25 mg/L de NO<sub>2</sub>.

#### 4.2.2. Concentración de nitritos

Mediante el Espectrofotómetro ( $\lambda$  410 nm) se determinó que el nivel de concentración de nitrito disminuye a medida que se incrementa el % del inóculo *Azotobacter sp.* Por otro lado la eficiencia de biodegradación de nitritos es mayor cuando incrementa la cantidad del inóculo al medio (Cuadro 7).

Cuadro 7. Promedios de la concentración de nitrito degradado al inicio y al final de la operación de la biodegradación por *Azotobacter sp.*

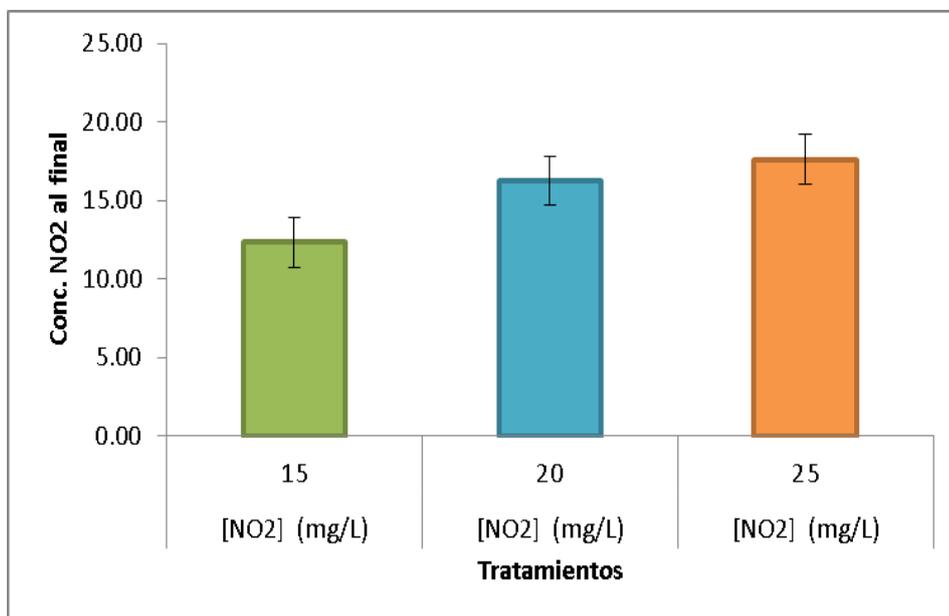
Conc. de NO <sub>2</sub> (mg/L)	Inóculo (% del volumen del medio en biorreactor)	Concentración nitrito a 410 nm				Eficiencia (%)
		Inicial		Final		
		Absorb	mg/L	Absorb	mg/L	
15	5	0.353	14.8	0.304	12.7	14.18
15	10	0.352	14.78	0.237	9.9	33.01
15	15	0.348	14.61	0.170	7.14	51.19
20	5	0.469	19.97	0.408	17.38	12.96
20	10	0.418	17.80	0.326	13.88	22.02
20	15	0.398	16.71	0.276	11.75	29.68
25	5	0.631	24.69	0.502	19.57	20.73
25	10	0.583	22.73	0.322	12.55	44.78
25	15	0.576	22.46	0.092	3.58	84.06

Según el cuadro 8, realizado el análisis de varianza se encontró diferencia significativa entre las dosificaciones de NO<sub>2</sub> con respecto a la degradación de NO<sub>2</sub>. Realizado la prueba de medias Tukey se encontró dos grupos diferenciados, el primer grupo corresponde a las concentraciones de NO<sub>2</sub> de 15 que representa la menor degradación de NO<sub>2</sub>, en tanto al segundo grupo corresponde a las concentraciones NO<sub>2</sub> de 20 y 25.

Cuadro 8. Prueba de Tukey para la concentración final de las concentraciones de nitritos degradados.

CONC. NO <sub>2</sub>	Medias	Grupos	Sig. para $\alpha = 0.05$
15	12.32	A	0.0299
20	16.25	B	0.0292
25	17.60	B	0.0292

*Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadística según prueba Tukey a 5% de nivel de significancia.*



**Figura 3.** Variación de concentración de nitrito al final de la operación con los biorreactores.

En la figura 3 muestra los valores de las concentraciones de nitrito al final de la operación con los biorreactores, en donde la concentración de nitrito al final es de 3.58 mg/L.

### 4.2.3. Oxígeno disuelto

Los consumos de oxígeno disuelto al inicio, a los 7 días y al final de la operación en biorreactores con los inóculos (Cuadro 9), en el que se puede apreciar que está en mayor grado en la concentración de NO<sub>2</sub> de 25 (mg/L) y en menor grado sobre la concentración de NO<sub>2</sub> de 15 (mg/L), tal como se muestran en los recuentos de concentración.

Cuadro 9. Promedios del oxígeno disuelto (OD) al inicio, a 7 días y al final de la operación.

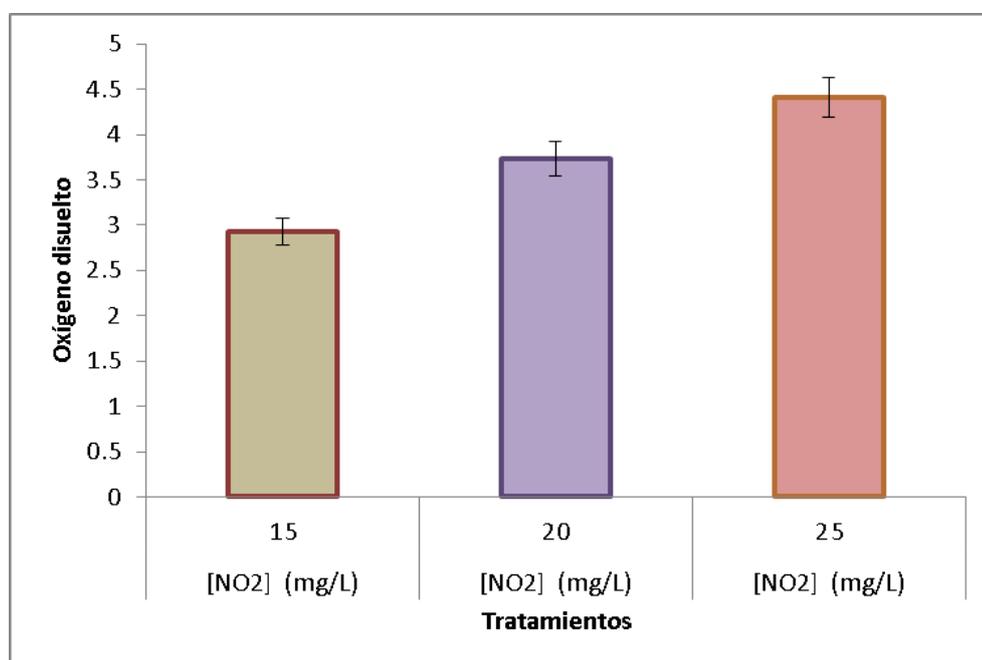
Concentración de NO <sub>3</sub> (mg/L)	Inoculo (% del volumen del medio en biorreactor)	Concentración OD inicial (mg/L)	Concentración OD a 7 días (mg/L)	Concentración OD final (mg/L)
15	5	0.27	1.00	3.31
15	10	0.89	2.71	4.95
15	15	2.42	3.80	7.03
20	5	1.97	3.15	4.05
20	10	2.11	3.70	4.12
20	15	2.98	4.29	7.23
25	5	1.11	3.03	5.84
25	10	2.96	1.99	6.93
25	15	3.64	4.29	9.87

Las diferencias estadísticas según Tukey para el consumo de oxígeno disuelto (Cuadro 10), apreciándose que no existen diferencias en las tres concentraciones de nitritos estudiados.

Cuadro 10. Prueba de Tukey para oxígeno disuelto final en los biorreactores air lift.

CONC. NO <sub>2</sub>	Medias	Grupos	Sig. para $\alpha = 0.05$
15	2.93	A	NS
20	3.73	A	NS
25	4.41	A	NS

*Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadística según prueba Tukey a 5% de nivel de significancia.*



**Figura 4.** Variación de oxígeno disuelto final.

De acuerdo el incremento de concentración de nitrito varían los resultados de oxígeno disuelto al final de la operación con los biorreactores, observando que en la concentración de nitrito al 25 mg/L, es la mayor en consumir oxígeno de un valor 9.87 mg/L.

#### 4.2.4. Temperatura

La temperatura de los biorreactores durante el período de operación de biodegradación de nitritos varió aproximadamente entre 27.63 C° a 31.10 C° (Cuadro 11).

Cuadro 11. Promedios de la temperatura al inicio, a 7 días y al final de la operación de degradación de nitritos por *Azotobacter sp.*

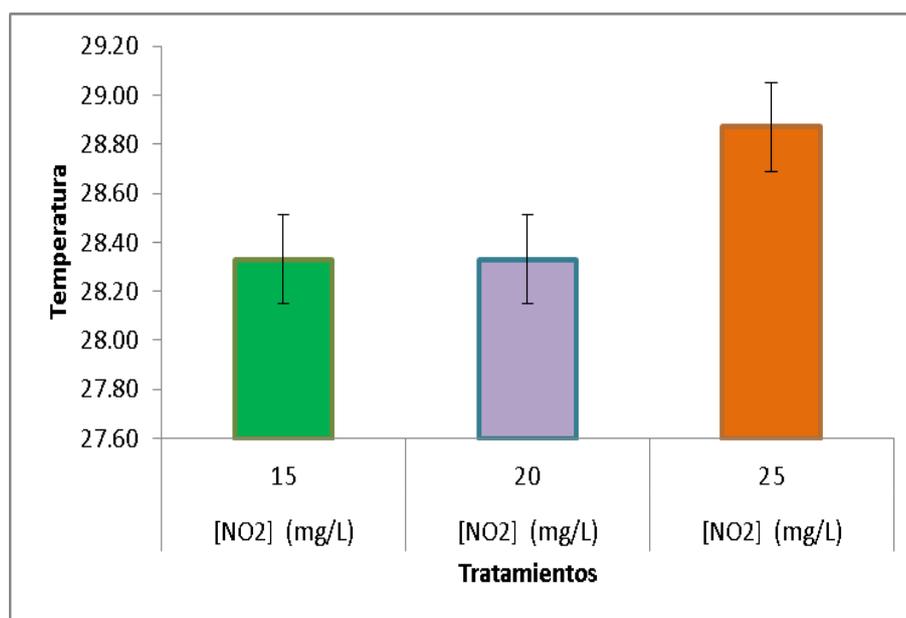
Concentración de NO <sub>2</sub> (mg/L)	Inoculo (% del volumen del medio en biorreactor)	Temperatura (°C)		
		<i>Inicial</i>	<i>7 días</i>	<i>Final</i>
15	5	27.63	27.78	27.81
15	10	27.63	27.81	29.23
15	15	27.63	28.97	30.43
20	5	27.63	28.80	27.83
20	10	27.63	28.70	28.90
20	15	27.63	28.90	30.90
25	5	27.63	28.69	29.50
25	10	27.63	28.83	29.77
25	15	27.63	29.02	31.10

Los resultados de la prueba de Tukey para promedios de temperatura en la operación de biorremediación de nitritos (Cuadro 12), observándose que no hay diferencias significativas en la temperatura alcanzada en los biorreactores.

Cuadro 12. Prueba de Tukey para temperatura final en los biorreactores air lift.

CONC. NO <sub>2</sub>	Medias	Grupos	Sig. para $\alpha = 0.05$
15	28.33	A	NS
20	28.33	A	NS
25	28.87	A	NS

*Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadística según prueba Tukey a 5% de nivel de significancia.*



**Figura 5.** Variación de temperaturas de los tratamientos con concentraciones de nitritos.

De acuerdo con la figura 5, las diferentes concentraciones de nitrito se observa que en las concentraciones de nitritos de 15 y 20 (mg/L) respectivamente las temperaturas son iguales a diferencia el de 25 mg/L de nitrito con un valor de 28.87 °C.

#### 4.2.5. Determinación del pH

El pH en los biorreactores donde se probaba la biorremediación de nitritos alcanzó al final de la operación para las concentraciones de nitritos en el que se puede apreciar que está en mayor grado en la concentración de NO<sub>2</sub> de 25 (mg/L) y en menor grado sobre la concentración de NO<sub>2</sub> de 15 (mg/L), (cuadro 13).

Cuadro 13. Promedios del pH al inicio, a 7 días y al final de la operación de degradación de nitritos por *Azotobacter sp.*

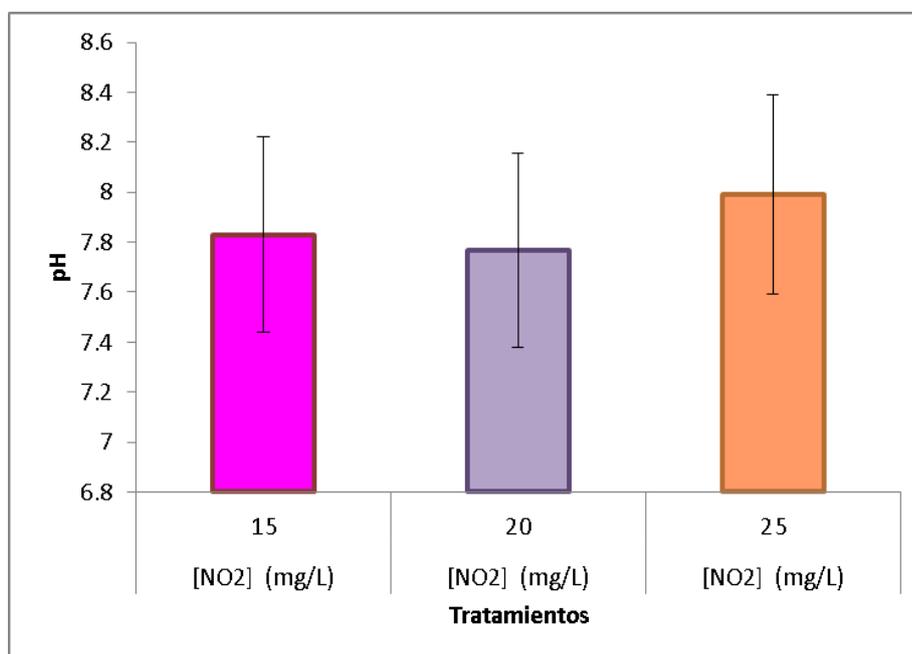
Concentración de NO <sub>2</sub> (mg/L)	Inóculo (% del volumen del medio en biorreactor)	pH		
		de operación		
		Inicial	7 días	Final
15	5	7.45	7.91	8.00
15	10	7.56	8.35	7.89
15	15	7.00	7.94	8.38
20	5	6.62	8.18	8.16
20	10	6.62	8.09	8.59
20	15	6.67	8.29	8.75
25	5	6.43	8.24	8.90
25	10	6.52	8.50	9.10
25	15	6.50	8.67	9.08

Los resultados de la prueba de Tukey para promedios de pH en la operación de biorremediación de nitritos (Cuadro 14), observándose que no hay diferencias significativas en el pH alcanzado en los biorreactores.

Cuadro 14. Prueba de Tukey para el pH al final de la operación en los biorreactores air lift

CONC. NO <sub>2</sub>	Medias	Grupos	Sig. para $\alpha = 0.05$
15	7.83	A	NS
20	7.77	A	NS
25	7.99	A	NS

*Lletras distintas en la misma columna indican diferencia estadística según prueba Tukey a 5% de nivel de significancia.*



**Figura 6.** Variación del pH para las diferentes concentraciones de NO<sub>2</sub> (gr/L).

En la figura 6 se muestra los valores de pH en las diferentes concentraciones de NO<sub>2</sub>, donde el valor máximo y mínimo es 7.99 y 7.77 respectivamente.

## V. DISCUSIÓN

Con respecto al aislamiento de la bacteria degradadora *Azotobacter sp* obtenida del suelo se encontraron varias colonias de microorganismos. Al respecto LADD *et al.* (1996) cita que en un suelo se puedan encontrar una gran variedad de poblaciones microbianas con capacidades metabólicas distintas. Por otra parte TORSVIK *et al.* (2003) menciona que un inconveniente en aislar una pequeña proporción de los componentes existentes en la comunidad microbiana, es que los medios sintéticos de laboratorio y el soporte es limitante a la proporción de microorganismos aislados.

En base a lo mencionado por WRENN Y VENOSA (1996), antes de iniciar la biorremediación, se procedió a aislar al *Azotobacter sp* del suelo, para seleccionarlos y evitar el ingreso de microorganismos exógenos, que podrían afectar en la parte microbiológica.

En el presente estudio se trabajó con la bacteria *Azotobacter sp.* al ser fijadora de nitrógeno que se desarrollan de forma natural en el suelo, concordando con los autores TORTORA, G., FUNKE, B., CASE, C. (2007), que a su vez éstas se dividen en dos grupos como las simbióticas (*Rhizobium*) y las

libres que viven en el suelo y no necesitan una planta para su reproducción (*Azotobacter*).

Durante la investigación el cultivo de *Azotobacter sp.* inducido en los biorreactores air lift, muestra el desarrollo de biomasa bacteriana, esto se debe a los factores condicionantes como pH y temperatura, demostrando un comportamiento directamente proporcional al incremento de la biomasa en el biorreactor, debido a que cuando la biomasa aumentó el pH sube (promedio final 7.68) y la temperatura se eleva (promedio 28.57 °C), esto se debe a que el metabolismo del *Azotobacter sp.* consumió los nitritos del agua como única fuente de energía y alcalinizando el medio de cultivo y al elevar la temperatura se tuvo gasto energético.

Por otro lado en la actividad degradadora de nitritos a concentraciones de 15, 20 y 25 mg/l están en la misma proporción con respecto al porcentaje de volumen del medio en biorreactor de 5, 10 y 15 % respectivamente, pero se puede apreciar la mayor eficiencia en la concentración de nitrito de 25 mg/l al 15 % del inóculo un 84.06 % de eficiencia, se pudo apreciar el desarrollo de biomasa, gasto de oxígeno (OD); lo que demuestra que *Azotobacter sp.* tiene la capacidad de degradar nitritos a ciertas concentraciones. Lo citado es concordante con lo mencionada por SVENJA *et al.* (1999) en este caso cita que otro género de bacteria llamada *Burkholderia* es utilizada para biorremediar suelos con hidrocarburos y en superficies húmedas; las *Pseudomonas aeruginosa* es otro de los

microorganismos en biorremediación, ya que están involucrados en el proceso de remoción de aceites vertidos en afluentes de agua (ROCKNE *et al.*, 2002).

Comparándose los resultados con los análisis estadísticos, estos muestran diferencias significativas en los tratamientos, considerando que al degradarse el nitrito aumenta la biomasa, el gasto de oxígeno (OD), la temperatura y pH.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se aisló la bacteria *Azotobacter* sp. mediante la aplicación del Medio Ashby, con propiedades de crecimiento en presencia de nitritos.
2. La bacteria *Azotobacter* sp. demostró tener mayor actividad biorremediante en medida en cuanto aumenta el inóculo bacteriano (15%), disminuyendo el nivel de concentración de nitrito a medida que se incrementa el porcentaje del inóculo *Azotobacter* sp., hasta en 3.58 mg/L; también se observó un incremento en el gasto de oxígeno (OD), temperatura y pH.
3. La eficiencia del *Azotobacter* sp. como agente biorremediante en la biodegradación de nitritos del agua resultó en un 84.06 % al 15 % de inóculo de siembra, con una concentración inicial de nitrito de 22.46 mg/L y final de 3.58 mg/L.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Determinar la eficiencia del medio de Ashby en el aislamiento de *Azotobacter* sp. adicionado de benzoato para preliminarmente identificar la especie de este género involucrada en la biorremediación de nitritos.
2. Estandarizar un protocolo de acción para la determinación espectrofotométrica de la concentración de nitritos en muestras de agua que facilite su detección.
3. Diseñar un tratamiento de degradación de nitrito in situ considerando un sistema de biorreactores aireados seriados.

## VIII. ABSTRACT

The presence of nitrite in crops as a result of the use of chemicals, cause pollution in water bodies where ultimately standing crop water drains into water bodies. *Azotobacter* sp., A non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria, can act as a degrading agent concentrations biorremediante nitrite (NO<sub>2</sub>). The operating conditions of the degradation of the three xenobiotics were established at 28 °C external temperature, pH 6.43 to 9.10, 7 days retention time, 0.72 vvm of air inlet flow, 800 mL volume of the bioreactor, in growing area 0078 m<sup>2</sup>. It was found that *Azotobacter* sp. It is capable of degrading nitrite concentrations up to 25 mg / L with an efficiency of 84.06% using an inoculum of 15% biomass workload air lift bioreactor 1 liter total capacity, determining that higher inoculum biomass degradation efficiency increases, maintaining all treatments carried out similar behavior regarding developed bacterial concentration, temperature, pH and dissolved oxygen, according to the statistical adjustment.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation. Segunda edición. Academic Press, Inc., San Diego.
- AMANN, R. I, W. LUDWIG Y K. H. SCHLEIFER. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microb. Rev.* 59: 143-169.
- APHA/AWWA/7WAB. 2001. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition, American Public Health Association, N.W. Washington. USA.
- BETANCOUR, M. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia medica.* VOLUMEN 35 N°3 (Supl 1), Cali, Colombia, 10 p.
- CHRISTOPHER W. KAPLAN R, CHRISTOPHER L. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(3): 1777-1786.

- DRYIDALE G, KASAN H, BUX F. Denitrification bacteria during activated sludge treatment. *Water SA*. 1999; 25: 357-362.
- EBRU C. Isolation and characterization of aerobic denitrifiers from agricultural soil. 2004; 29: 9 -14.
- EL PERUANO. 2010. DECRETO SUPREMO N°003 -2010- MINAM, Aprueban los Límites Máximos Permisibles (LMP) de Emisiones Atmosféricas y Efluentes Líquidos Para la Industria Siderúrgica. Lima, Perú. 11 p.
- FLAVIO B, LEONARDO F, ZACHIA M. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiología*. 1999; 30 (3).
- FUNDACIÓN IBÉRICA PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA. 2006. Seguridad alimentaria en la producción de alimentos, Madrid, España.
- LADD, J. N., R. C. FOSTER, P. NANNIPIERI Y J. M. OADES. 1996. Soil structure and biological activity. *Soil Biochem*. 9:23-78.
- LEE H, LEE J, CHEON J, LEE K. Attenuation of Petroleum Hydrocarbons in Smear Zones: A Case Study. *Journal of Environmental Engineering*. 2001; 127(7): 639-647.

- LÓPEZ, C. 1998. Transformación de tetracloroetano (TcCA) por biopelículas metilotróficas. Tesis Maestría en Biotecnología y Bioingeniería, Trujillo, Escuela de Postgrado, Sección de Postgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo.
- LÓPEZ J, GARCÍA O, GRIMA J, BALLESTEROS J, PÉREZ. Técnicas de biorrecuperación in situ en acuíferos contaminados por metales pesados. 2000.
- MIRANDA, H., ROBLES, H., VILLANUEVA, L., RODRIGUEZ, C. 2006. Biorreactores, Diseño y Aplicaciones, Sociedad Peruana de Biotecnología, Trujillo, Perú.
- NELSON K, WEINEL C, PAULSEN I, DODSON R, HILBERT H, MARTINS DOS SANTOS V, FOUTS D, GILL S, POP M, HOLMES M, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*. 2002; 4: 799-813.
- ONGLEY, E. 1997. Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos, Burlington, Canadá.
- ROCKNE K, CHEE-SANFORD J, SANFORD R, BRIAN P, JAMES T, STALEYAND S. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure

cultures under nitrate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* . 2000; 66: (4)1595-1601.

SANJEET M, JEEVAN J, RAMESH C, BANWARJ L. Evaluation of Inoculum Addition To Stimulate in situ Bioremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil. *Applied And Enviromental Microbiology*. 2001; 67(4):1675-1681.

SCHMIDT W. Suelos contaminados con hidrocarburos: la biorremediación como una solución ecológicamente compatible. *Cooperación Técnica Alemana (GTZ)*. 2000.

SVENJA R, ALEXANDER N, ULF S, PETER K. Differential detection of key enzymes of polyaromatic hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology*. 1999; 145: 1731-1741.

TORSVIK, V., F. L .DAAE, R. A. SANDAA Y L. OVREAS. 1990. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J.Biotechnol*. 64:53-62.

TORSVIK, V., L. OVREAS Y T. F. THINGSTAD. 2003. Prokaryotic Diversity - Magnitude, Dynamics and Controlling Factors. *Science*. 296:1064-1066.

- TORTORA, G., FUNKE, B., CASE, C. 2007. Introducción a la microbiología, Buenos Aires, Argentina.
- TRUPER, H. G. 1992. Prokaryotes- an overview with respect to biodiversity and environmental importance. *Biodiv.Cons.* 1:227-236.
- ULLA B, FLEMMING E, CARSTEN J. Method for spiking soil samples with organic compounds. *Applied and Environmental Microbiology.* 2002. 1816.
- WRENN, B. A. Y A. D. VENOSA. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbondegrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42 :252-258.

## **ANEXOS**

### 10.1. Galería de Fotos



Figura 7. Desinfección/esterilización de los biorreactores air lift.

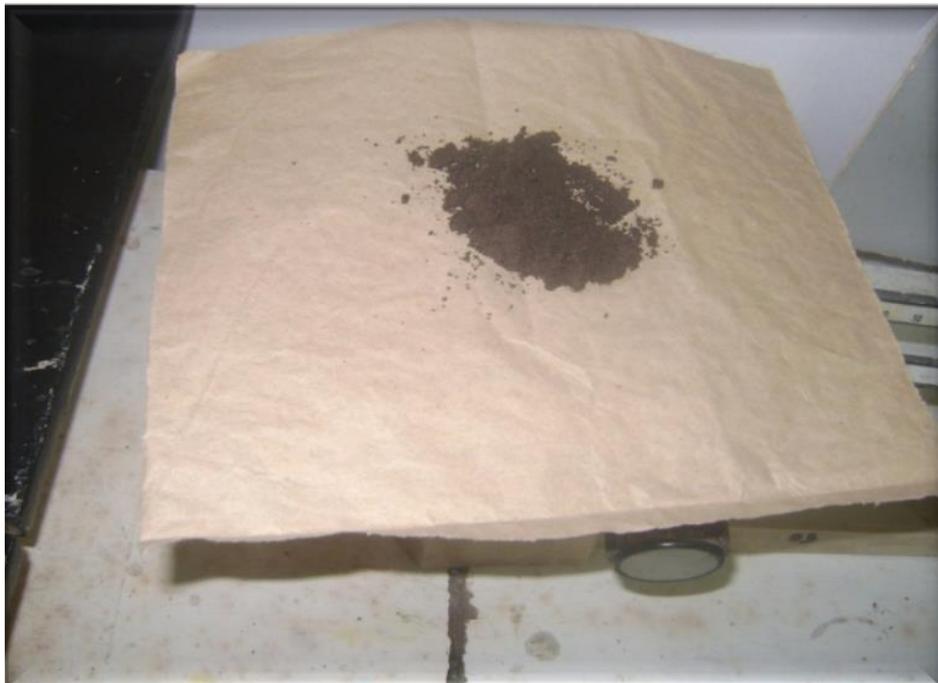


Figura 8. Pesando el suelo para el aislamiento de microorganismos.



Figura 9. Filtrando el suelo para realizar las diluciones.



Figura 10. Pipeteando los diluyentes para el aislamiento de microorganismos del suelo.



Figura 11. Asilamiento de microorganismos en placas.

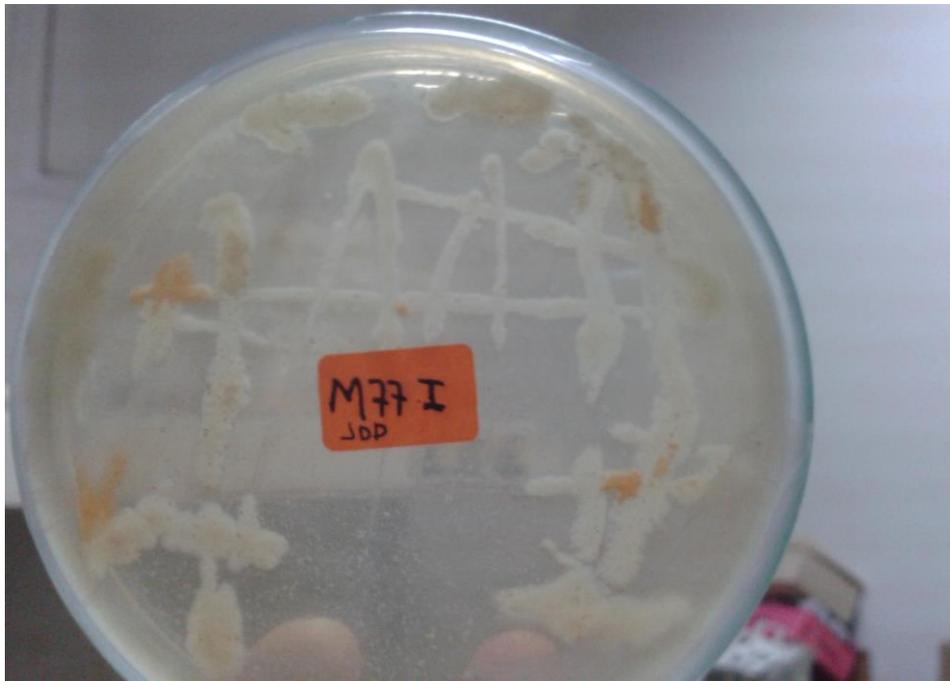


Figura 12. Crecimiento de microorganismo en el medio M77.



Figura 13. Crecimiento de microorganismo aislado.

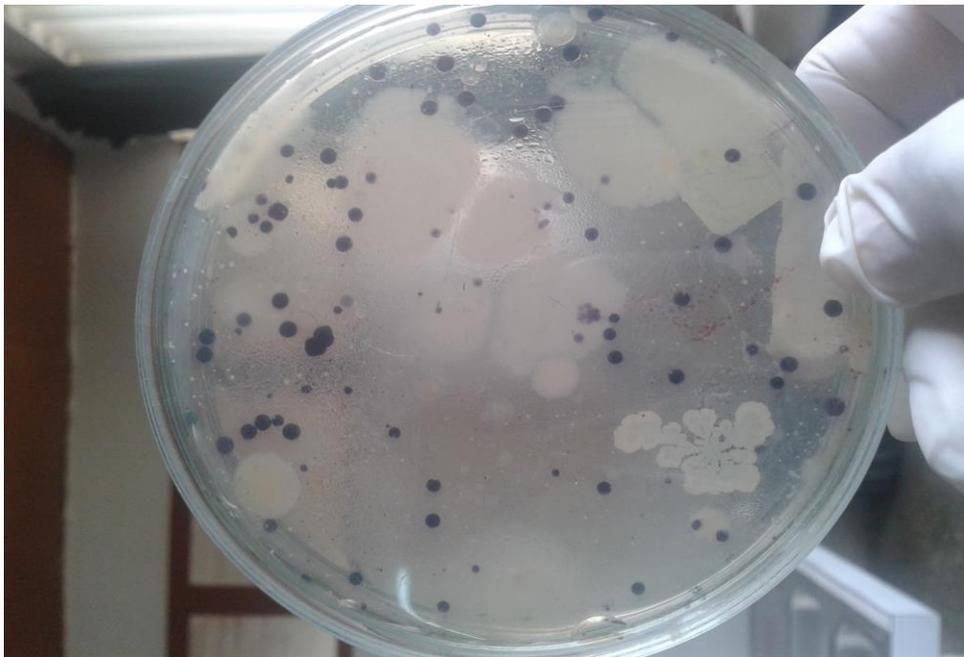


Figura 14. Microorganismos desarrollados en la placa.



Figura 15. Biorreactores con el medio de cultivo y el inóculo en operación.



Figura 16. Obtención de los efluentes para mediciones de pH, OD, biomasa.



Figura 17. Medición de oxígeno disuelto.



Figura 18. Medición en espectrofotómetro de la eficiencia de biorremediación del nitrito.



Figura 19. Plaqueo de las muestras con los microorganismos asilados.



Figura 20. Conteo de microorganismos.