



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE
Ralstonia pickettii DE CROMO VI EN AGUA PROVENIENTE DE
CURTIEMBRE**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: KEVIN ALEXANDER VELOZ CANDO

TUTORA: ING. PAOLA CHILUIZA RAMOS MSc

RIOBAMBA – ECUADOR

2018

©2018, Kevin Alexander Veloz Cando

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de investigación: **“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE *Ralstonia pickettii* DE CROMO VI EN AGUA PROVENIENTE DE CURTIEMBRE”**, de responsabilidad del señor Kevin Alexander Veloz Cando, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros de la Unidad de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Ing. Paola Cristina Chiluiza Ramos

DIRECTORA DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

Dr. Luis Elías Guevara Iñiguez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Kevin Alexander Veloz Cando, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Kevin Alexander Veloz Cando

CI: 0604190686

DEDICATORIA

A mis padres Marcia Cando y Jorge Veloz por su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida, A mi hermana por motivarme a cumplir cada una de las metas que me propongo. A mi novia por acompañarme y apoyarme durante toda mi vida universitaria.

Kevin

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme salud, fortaleza y sabiduría para culminar con éxito una etapa más de mi vida.

A mi familia por el cariño y apoyo brindado durante cada etapa de mi vida.

A la Escuela Superior politécnica de Chimborazo por forjarme como profesional y contribuir de una u otra forma en mi evolución como persona.

A la Ing. Paola Chiluiza Ramos MSc, por ser la guía principal en el desarrollo de mi trabajo de titulación, por el tiempo, conocimientos y consejos brindados.

A mi asesor Dr. Luis Guevara por toda la ayuda brindada en el desarrollo de mi trabajo de titulación.

A todas las técnicas docentes de los laboratorios en los cuales trabajé, por abrirme las puertas y compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.

Kevin

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
 CAPÍTULO I	
 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	4
1.1 Antecedentes de la investigación	4
1.2 Bases teóricas	5
1.2.1 Cromo	5
<i>1.2.1.1 Efectos del cromo hexavalente en la salud humana</i>	5
<i>1.2.1.2 Efectos del cromo hexavalente en los ecosistemas</i>	6
1.2.2 Curtiembre	7
<i>1.2.2.1 Tipos de curtiembre</i>	7
<i>1.2.2.2 Etapas del proceso de curtido y residuos generados</i>	7
<i>1.2.2.3 Volumen de agua usado por proceso</i>	9
1.2.3 Industria de curtiembre en Ecuador	9
1.2.4 Límites máximos permisibles para descarga de cromo hexavalente	10
<i>1.2.4.1 Legislación ecuatoriana</i>	10
<i>1.2.4.2 Legislación Sudamericana</i>	10
1.2.5 Tratamientos convencionales para Cr VI en aguas residuales de curtiembre	11
<i>1.2.5.1 Intercambio iónico</i>	11
<i>1.2.5.2 Reducción fotocatalizada</i>	12
<i>1.2.5.3 Electrocoagulación</i>	12
1.2.6 Tratamientos biológicos para Cr VI en agua residual de curtiembre	13

<i>1.2.6.1 Fitorremediación</i>	13
<i>1.2.6.2 Biorremediación</i>	13
<i>1.2.7 Mecanismos microbianos de resistencia a metales pesados</i>	14
<i>1.2.8 Mecanismos bioquímicos para la biorremediación de metales pesados</i>	15
<i>1.2.8.1 Bioacumulación</i>	15
<i>1.2.8.2 Transformación de valencia</i>	16
<i>1.2.8.3 Precipitación química extracelular</i>	17
<i>1.2.8.4 Mecanismo simbiótico</i>	17
<i>1.2.9 Ralstonia pickettii</i>	18

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	20
2.1 Tipo y diseño de la investigación	20
2.2 Unidad de análisis	20
2.3 Población de estudio	20
2.4 Tamaño de la muestra	21
2.5 Diagrama de procedimiento	21
2.6 Etapas de la investigación	22
<i>2.6.1 Preparación de medios de cultivo</i>	22
<i>2.6.2 Preparación de medios de cultivo suplementados</i>	22
<i>2.6.3 Activación de la cepa de Ralstonia pickettii</i>	22
<i>2.6.4 Elaboración del cultivo overnight</i>	22
<i>2.6.5 Conservación de la cepa</i>	23
<i>2.6.5.1 Subcultivos</i>	23
<i>2.6.5.2 Congelación ordinaria</i>	23
<i>2.6.6 Caracterización del agua residual de curtiembre</i>	24
<i>2.6.6.1 Muestreo</i>	24
<i>2.6.6.2 Caracterización de parámetros físico-químicos y microbiológicos</i>	24

<i>2.6.7 Evaluación de resistencia al cromo hexavalente</i>	25
<i>2.6.8 Pruebas de degradación de cromo hexavalente en agua sintetizada en laboratorio</i>	25
<i>2.6.9 Pruebas de degradación de cromo hexavalente en agua residual de curtiembre</i>	26

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
3.1 Activación de la cepa de <i>Ralstonia pickettii</i>	28
3.2 Caracterización del agua residual de curtiembre	29
3.3 Evaluación de la resistencia al cromo hexavalente	32
3.4 Pruebas de degradación de cromo hexavalente en agua sintetizada en laboratorio	34
<i>3.4.1 Análisis estadístico</i>	35
3.5 Degradación de cromo hexavalente en agua residual de curtiembre	39
<i>3.5.1 Análisis estadístico</i>	41
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Volumen de agua por proceso en la curtiembre	9
Tabla 2-1: Sistemas bacterianos para expulsión de iones inorgánicos tóxicos.....	15
Tabla 3-1: Microorganismos que reducen Cr VI a Cr III.....	17
Tabla 4-1: Compuestos tóxicos degradados por <i>R. pickettii</i>	19
Tabla 1-2: Diseño experimental de la investigación.....	20
Tabla 2-2: Diseño experimental para las pruebas de degradación de Cr VI en agua sintética.....	26
Tabla 3-2: Diseño experimental para las pruebas de degradación de Cr VI en agua residual.....	27
Tabla 1-3: Estabilidad morfológica de la cepa ATCC 700591	28
Tabla 2-3: Caracterización fisicoquímica y microbiológica del agua residual.....	29
Tabla 3-3: Resistencia de <i>R. pickettii</i> al cromo hexavalente.....	33
Tabla 4-3: Resultados de la degradación en agua sintética.....	35
Tabla 5-3: Análisis ANOVA para la concentración inicial 5 mg/L.....	35
Tabla 6-3: Análisis ANOVA para la concentración inicial 10 mg/L.....	36
Tabla 7-3: Análisis ANOVA para la concentración inicial 15 mg/L.....	37
Tabla 8-3: Resultados de la degradación en agua residual.....	40
Tabla 9-3: Análisis estadístico de la degradación de Cr VI en agua residual.....	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Diagrama de tratamiento de agua residual por intercambio iónico.....	11
Figura 2-1: Diagrama de tratamiento de agua residual por electrocoagulación.....	12
Figura 3-1: Mecanismo de reducción de cromo hexavalente.....	16
Figura 1-2: Cultivo overnight.....	23
Figura 2-2: Pruebas de degradación de Cr VI en agua sintética.....	25
Figura 1-3: Crecimiento bacteriano en la unidad de análisis.....	34
Figura 2-3: 1,5-Difenil-carbohidraazida en agua sintética.....	34
Figura 3-3: 1,5-Difenil-carbohidraazida en agua residual.....	39
Figura 4-3: Sedimento en las muestras centrifugadas.....	40

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1: Principales provincias productoras de cuero en Ecuador.....	10
Gráfico 1-3: Concentraciones finales de Cr VI en los ensayos 5mg/L, 10mg/L y 15 mg/L.....	38

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar la capacidad de la bacteria *Ralstonia pickettii* para la degradación de cromo hexavalente (Cr VI) en agua residual de curtiembre. El cromo hexavalente es un elemento tóxico, comprobado como cancerígeno en humanos de acuerdo a la IARC (International Agency for Research on Cancer) y está presente en el agua residual del curtido de pieles, la investigación inició evaluando la resistencia de *R. pickettii* al Cr VI utilizando agar nutritivo suplementado con dicromato de potasio como medio de cultivo, la resistencia máxima se estableció a los 200 mg/L de Cr VI. Posteriormente se determinó el porcentaje de degradación de Cr VI en caldo nutritivo suplementado con dicromato de potasio, obteniéndose valores de 95.2 %, 92.3 % y 90.87 % de degradación de Cr VI para las concentraciones iniciales de 5, 10 y 15 mg/L de Cr VI respectivamente, por último se determinó el porcentaje de degradación en agua residual del proceso de curtido estableciendo tres unidades de análisis con diferente concentración bacteriana y controles a las 24, 48 y 72 horas, los resultados fueron 57, 14 % de degradación a las 24 horas y 58.73 % de degradación a las 48 y 72 horas, concluyendo que las variaciones en los factores de biomasa y tiempo de incubación no intervienen de manera significativa en la capacidad de degradación de Cr VI de *R. pickettii*.

Palabras clave: <CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES>, <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <AGUAS RESIDUALES>, <CURTIEMBRE>, <CROMO HEXAVALENTE>, <BACTERIA (*Ralstonia pickettii*)>.

ABSTRACT

The present investigation objective is to evaluate the capacity of the bacteria *Ralstonia pickettii* for the degradation of Hexavalent Chromium (Cr VI) in waste water of tannery. The Hexavalent Chromium is a toxic element, tested as carcinogenic in humans according to IAR (International Agency for Research on Cancer), it can be found in the waste water of tanning. We started evaluating the resistance of *R.pickettii* to Cr VI using nutritive agar supplemented with dichromate of potassium as a culture medium. The maximum resistance was established to 200 mg/L of Cr VI. Later, we determined the percentage of degradation of Cr VI in nutritive broth supplemented with dichromate of potassium. The following values were gotten: 95.2 %, 92.3 % and 90.87 % of degradation of Cr VI for the initial concentrations of 5, 10 and 15 mg/L of Cr VI respectively. The degradation percentage in waste water of the tanning process was also determined establishing three units of analysis with different bacteria concentration and controls to 24, 48 and 72 hours. The results were 57.14 % of degradation to 24 hours and 58.73 % to degradation to 48 and 72 hours. It is concluded that the variation on the factors of biomass and time of incubation do not intervene meaningfully in the degradation capacity of Cr VI of *R.pickettii*.

Key words: <EXACT AND NATURAL SCIENCES>, <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <WASTE WATER>, <TANNING>, <CHROMIUM>, <HEXAVALENT>, <BACTERIA (*Ralstonia pickettii*)>.

INTRODUCCIÓN

Identificación del Problema

La actual demanda de artículos de cuero, ha generado un crecimiento de la industria de curtiembre, incrementando el riesgo de contaminación por cromo VI presente en las aguas residuales del proceso de curtido. En Ecuador, el crecimiento de la industria de curtiembre se ha evidenciado principalmente en la provincia de Tungurahua y ha permitido procesar anualmente alrededor de 350 mil cueros y pieles durante los últimos años, de los cuales gran parte se exporta a países como Italia, Perú y Colombia según el Instituto de promoción de exportaciones e inversiones de Ecuador citado en (Salinas, 2014, p. 21).

El Cromo es el séptimo elemento más abundante en la Tierra, en su estado trivalente resulta ser prácticamente inocuo por su incapacidad de solubilizarse, sin embargo en su estado hexavalente es altamente tóxico por lo que los impactos ambientales ocasionados por la industria de la curtiembre son igual de considerables que los impactos que generan la industria minera y petrolera. (Esparza & Gamboa, 2001, p. 42)

Los procesos dentro de una curtiembre pueden requerir entre 50 y 100 litros de agua por cada Kilogramo de piel salada (Esparza & Gamboa, 2001, p. 42). Según Zárate, et al, (1993, p. 26) solo en la etapa de curtido se requiere un 70 % de agua respecto al peso en Kilogramos de piel tratada generando efluentes con un considerable contenido de Cr III (trivalente) y Cr VI (hexavalente), este último considerado por la IARC (International Agency for Research on Cancer) como un cancerígeno comprobado en humanos (Téllez, et al., 2004, p. 50).

Entre las principales alternativas de tratamiento para las aguas residuales provenientes de curtiembre se encuentran los tratamientos mecánicos que resultan ser muy costosos y los tratamientos químicos que emplean compuestos como Hidróxidos y Sulfuros para la precipitación del metal, lo que supone un inconveniente por la generación de lodos, que también están sujetos a restricciones. (Duarte, et al., 2009, p. 290)

Por lo que surge la necesidad de proponer alternativas ambientalmente adecuadas para la descontaminación de aguas residuales provenientes del proceso de curtido de pieles.

Justificación de la Investigación

Ecuador cuenta con una Norma de Calidad Ambiental para el recurso agua que se encuentra en el Anexo 1 del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, la cual establece para cromo hexavalente un límite máximo permisible de 0.5 mg/L en descargas a cuerpos de agua superficiales o sistemas de alcantarillado, por lo tanto es importante proponer alternativas ambientalmente amigables y económicamente rentables, que permitan minimizar los impactos ocasionados por la industria de curtiembre.

Para la reducción de Cromo hexavalente hasta su estado más inocuo (Cromo trivalente) se utiliza comúnmente procesos químicos costosos y agresivos, que requieren el uso de compuestos adicionales para generar reacciones químicas. Existen otras alternativas como los procesos biológicos, que son capaces de reducir la concentración de cromo VI en aguas residuales de curtiembre a menor costo, con resultados satisfactorios. (Duarte, et al., 2009, p. 290)

El uso de microorganismos puede ser una alternativa para la degradación de Cromo VI en aguas residuales provenientes de curtiembre debido a la capacidad de adaptación que poseen ciertas especies en medios con altas concentraciones de metales y a los variados mecanismos que ciertos microorganismos poseen para la degradación de compuestos tóxicos. (Torres, 2003, p. 3)

Ralstonia pickettii es una bacteria Gram negativa, no fermentativa, oxidasa positiva y ubicua en el ambiente, con capacidad de adaptarse a medios con elevadas concentraciones de metales, además al ser un microorganismo oligotrófico es capaz de desarrollarse en ambientes con baja concentración de nutrientes. (M.P. Ryan, et al., 2007, p. 754)

R. pickettii es efectiva para la degradación de varios contaminantes como fenoles, cresoles, tolueno y compuestos aromáticos (M.P. Ryan, et al., 2007, p. 755), además Xie, et al (2010, p. 4063) menciona que *R. pickettii* es capaz de resistir a elevadas concentraciones de metales pesados como cadmio, cobre y zinc, por lo que se propone la evaluación de su capacidad de degradación de cromo hexavalente en agua residual proveniente de curtiembre.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la capacidad de *Ralstonia pickettii* para la degradación de Cromo Hexavalente en agua residual de curtiembre.

Objetivos específicos

- Caracterizar física, química y microbiológicamente el agua residual proveniente de la industria de la curtiembre.
- Evaluar la resistencia de *Ralstonia pickettii* al cromo hexavalente.
- Determinar el porcentaje de degradación de cromo hexavalente en agua sintetizada en laboratorio, luego del tratamiento con *Raltonia pickettii*.
- Determinar el porcentaje de degradación de cromo hexavalente en agua residual proveniente de curtiembre, luego del tratamiento con *Raltonia pickettii*.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Antecedentes de la investigación

Como menciona Ramírez, et al (2009, p. 78) en su investigación, son varios los microorganismos aislados de medios contaminados con cromatos y de medios naturales no contaminados, con capacidad para reducir cromo VI, los cuales han sido propuestos como una alternativa para la biorremediación de ambientes contaminados con cromo.

En su trabajo de investigación Guevara Zumárraga (2010, p. 63) utilizó un consorcio formado por dos microorganismos no especificados para tratar agua sistémica con concentraciones de hasta 50 mg/L de cromato de potasio (K_2CrO_4) en condiciones de laboratorio, obteniendo una remoción de cromo VI del 98% y cromo total del 70% para el microorganismo I5 y del 23% para el microorganismos M3, partiendo de una concentración de 10 mg/L.

En otro trabajo, Rengifo Gallego et al (2012, p. 1058) realizó ensayos de remoción de cromo utilizando la asociación alga – bacteria *Bostrychia calliptera* (*Rhodomelaceae*), obteniendo como resultado una remoción de cromo VI del 87% partiendo de una concentración de 10 mg/L.

Siguiendo en el contexto de los microorganismos utilizados en bioremediación, *Ralstonia pickettii* es un bacilo Gram negativo, oxidasa positiva, resistente a elevadas concentraciones de metales pesados como plata (50 ppm) (Ramírez , 2012, p. 44) y capaz de adaptarse en medios con concentraciones de nutrientes muy bajas. (M.P. Ryan, et al., 2007, p. 754).

Yang, et al (2010) citado en (Regueira, 2017, p. 23) menciona que *Ralstonia pickettii* es una bacteria resistente a elevadas concentraciones de cobre y una capacidad máxima de absorción de 27 a 38 mg/g de células, mayor que la capacidad máxima de absorción de *Cupriavidus taiwanensis* de 19 mg/g de célula.

En su artículo “*Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications”, M.P. Ryan, et al (2007, p. 756) menciona que *Ralstonia pickettii* es una bacteria con un

metabolismo diverso y capacidades para la degradación de múltiples contaminantes como benceno, fenol, cresol y una serie de compuestos aromáticos.

1.2 Bases teóricas

1.2.1 Cromo

El cromo es un metal distribuido por toda la corteza terrestre generalmente en combinación con otras sustancias, su mayor concentración está en las rocas básicas de donde se extrae para su posterior uso en la industria. Del total de la producción anual a nivel mundial, se calcula que aproximadamente un 11% pertenece a América latina y es destinado mayoritariamente para la elaboración de acero, vidrio y cemento. (Galvão & Corey, 1987, p. 1)

El cromo en la naturaleza se encuentra principalmente en dos formas, la primera con valencia +3 que es relativamente inofensiva, e incluso en bajas concentraciones es indispensable para el metabolismo del ser humano por su papel dentro de la tolerancia a la glucosa (Galvão & Corey, 1987, p. 1), la segunda con valencia +6, 1000 veces más tóxico que el cromo +3 y con una solubilidad que le permite transportarse con facilidad dentro de los diferentes cuerpos de agua (Chávez, 2010, p. 43).

1.2.1.1 Efectos del cromo hexavalente en la salud humana

Según Luiz. A. C Galvão y Germán Corey (1987, p. 14), en el cuerpo humano existen tres vías de acceso de cromo y son las siguientes:

- **Vía de Inhalación:** Es la vía de acceso más efectiva, permite una absorción del 50% del cromo total que ingresa, dependiendo de la forma química, el tamaño de la partícula y la solubilidad. Los compuestos hexavalentes se absorben en el pulmón con más rapidez que los compuestos trivalentes. generando cuadros de bronquitis asmática que desaparece cuando cesa la exposición.
- **Vía digestiva:** Es una vía poco eficaz que permite una absorción de apenas el 6% del cromo total que ingresa al organismo.
- **Vía cutánea o por contacto:** Es una vía de acceso con una capacidad de absorción prácticamente nula, sin embargo según Porras (2010, p. 45), el contacto con cromo

hexavalente puede ocasionar dermatitis alérgica y generar úlceras de 5 hasta 10 mm en el dorso de las manos y dedos.

Una vez que el cromo es absorbido pasa al torrente sanguíneo en forma trivalente la cual se distribuye a varios órganos, principalmente el hígado, el bazo y los huesos, con un tiempo de permanencia que depende del compuesto que fue absorbido y que puede variar entre 12 horas y 83 días.

Las principales vías de excreción son la orina y las heces, sin embargo gran parte del cromo absorbido puede no ser excretado, permanecer en el pulmón y ser detectado mucho tiempo después de la exposición. Debido a este fenómeno se ha demostrado que la concentración de cromo en el pulmón puede aumentar progresivamente, incluso desde la niñez (Galvão & Corey, 1987, p. 13)

El principal problema de la absorción de cromo hexavalente ocurre durante la reducción celular del mismo, donde se generan radicales libres que atacan al ADN y causan daños en sus hebras, además afectan a los procesos de replicación, reparación y síntesis de ADN, generando mutaciones, por lo que es considerado un cancerígeno comprobado en humanos de acuerdo a Sarkar (2002, p. 138) y la IARC (International Agency for Research on Cancer) (Téllez, et al., 2004, p. 50)

1.2.1.2 Efectos del cromo hexavalente en los ecosistemas (Chávez, 2010, pp. 45-46)

En un ecosistema acuático el cromo hexavalente se presenta muy soluble y estable por lo que es fácilmente transportado, aunque finalmente se reduce a cromo trivalente por acción de sustancias orgánicas, azufre, amonio, sulfuro de hierro, ácido sulfhídrico y nitritos para después precipitar y acumularse en los sedimentos que sirven de alimento para especies acuáticas.

En los ecosistemas terrestres por el contrario, el cromo hexavalente es muy inestable por efecto de las reacciones redox. El cromo trivalente en condiciones ácidas fácilmente puede transformarse en cromo hexavalente por lo que no es recomendable depositar residuos de curtiembre en rellenos sanitarios que contengan residuos de otros procesos industriales que al descomponerse puedan generar un ambiente ácido.

1.2.2 Curtiembre

La curtiembre es una fábrica que transforma el cuero crudo proveniente de la industria de la carne, en un material estable con características adecuadas para la manufactura de calzado, bolsos y otras prendas de cuero. Esta estabilidad se consigue por medio de la combinación de las proteínas con agentes químicos conocidos como curtientes. (Salvador, 2013, pp. 20-21)

1.2.2.1 Tipos de curtiembre

- **Curtiembre artesanal:** Contempla procesos manuales en pequeñas fábricas, su producción es limitada y prioriza la calidad del acabado y la exclusividad de sus productos. (Salinas, 2014, pp. 32-33)
- **Curtiembre industrial:** Se enfoca en la producción masiva de cueros, sus procesos se llevan a cabo con la ayuda de maquinaria y se adicionan compuestos químicos en las etapas de curtido o recurtido y teñido para mejorar la resistencia del producto final. (Salinas, 2014, p. 32)

1.2.2.2 Etapas del proceso de curtido y residuos generados (Zárate, et al., 1993, pp. 6-10)

- **Recorte en recepción:** En esta primera etapa se procede a recortar las partes de la piel que no serán utilizadas en el proceso de curtido como el cuello, la cola y las extremidades, en el caso de ser piel proveniente de ganado ovino también se debe recortar la lana. Este proceso genera residuos como carnazas, grasa, sangre y en ocasiones excremento lo que aporta con carga orgánica a los residuos de la curtiembre.
- **Remojo:** Es un proceso que consume grandes cantidades de agua que arrastran consigo tierra, cloruros y materia orgánica como sangre y estiércol. Los efluentes del proceso contienen también hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio, tensoactivos y preparaciones enzimáticas, sustancias químicas usadas durante el mismo.
- **Pelambre:** Es un proceso que requiere ablandamiento de la piel para facilitar la eliminación de lana o pelo, por lo tanto se utiliza grandes volúmenes de agua y cal, este proceso representa el mayor aporte de carga orgánica y eleva el pH del agua residual entre 11 y 12.

- **Descarne:** Este es un proceso mecánico que elimina cualquier resto de carnazas y grasas que pueda quedar en la piel, dejando como resultado residuos con alta carga orgánica y humedad.
- **Desencalado:** En este proceso se retira los restos de cal y sulfuros usados en etapas anteriores para evitar interferencias durante el curtido, para esto se utiliza ácido sulfúrico, clorhídrico, láctico, fórmico y bórico, los cuales estarán presentes en el agua residual del proceso.
- **Desengrase:** Para el desengrase se utilizan grandes volúmenes de agua junto a agentes tensoactivos y solventes como resultado en las descargas encontramos materia orgánica y solventes como el kerosene, monoclorobenceno y percloroetileno (en ciertos casos).
- **Purga:** En la purga se realiza una limpieza de los poros de la piel utilizando tripsina y enzimas proteolíticas, las mismas que estarán presentes en las descargas con un pH neutro.
- **Piquelado:** En esta etapa se prepara la piel para absorber los compuestos usados durante el curtido, en primer lugar se utiliza cloruro de sodio para permitir que la piel soporte la acción de los ácidos sulfúrico y fórmico que se añaden posteriormente. Las descargas de este proceso presentan elevada salinidad y un pH entre 2.5 y 3.
- **Curtido:** Este proceso es el más importante y permite que el colágeno de la piel se estabilice, para esto se emplean curtientes vegetales o minerales, siendo las sales de cromo trivalente las más utilizadas a nivel industrial. El cromo que no ha sido fijado en la piel es arrastrado por el agua generando efluentes con contenido de Cr III y en menor proporción de Cr VI.
- **Ecurrido:** Es un proceso mecánico que elimina la humedad de la piel. Su efluente es de bajo volumen pero puede llegar a ser contaminante por la presencia de cromo.
- **Rebajado:** Al igual que el escurrido, es un proceso mecánico que permite que la piel adquiera un grosor uniforme. Este proceso genera la mayor cantidad de residuos sólidos y es potencialmente contaminante por la presencia de cromo.
- **Recurtido y teñido:** Es este segundo curtido se utilizan sales diferentes al cromo y curtientes sintéticos como los sintanos, para el teñido es común usar tintes con base de anilina a altas temperaturas.
- **Recorte y acabado:** Nuevamente se da uniformidad al cuero, lo cual puede generar residuos sólidos

1.2.2.3 Volumen de agua usado por proceso

Las diferentes tipos de agua residual generados en una curtiembre, son resultado del uso de grandes volúmenes de agua en cada uno de los procesos (Ver Tabla 2-1). Como resultado, el agua puede arrastrar materia en suspensión y agentes contaminantes que alterar sus propiedades físicas, químicas y biológicas. (Méndez, et al., 2007, p. 21)

Tabla 1-1: Volumen de agua por proceso en la curtiembre

OPERACIÓN	VOLUMEN DE AGUA (% peso de pieles)
Pre-remojo	300
Enjuague	600
Remojo	300
Enjuague	1000
Pelambre	300
Enjuague	1000
Descarne	-
Desencalado	200
Purga	200
Desengrase	100
Enjuague	500
Piquelado	80
Curtido	70

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

Fuente: (Zárate, et al., 1993, p. 26)

1.2.3 Industria de curtiembre en Ecuador (Salinas, 2014, pp. 21-23)

En Ecuador, el inicio de la industria de la curtiembre data de la época precolombina, época en la cual el cuero era usado para cubrir el cuerpo del frío y como escudo en guerras, con la llegada de los españoles y la aparición del primer vehículo se da inicio a la industria manufacturera de calzado, ropa y pastas de libros.

Durante la época colonial, Ambato en la provincia de Tungurahua se convierte en la principal ciudad curtidora de cuero del país, hecho que se mantiene hasta la actualidad (Ver Gráfico 1-1), posteriormente en los años 90 se funda la Asociación Nacional de Curtidores de Ecuador (ANCE) que en la actualidad procesa anualmente un promedio de 350 mil pieles, destinadas para el consumo interno

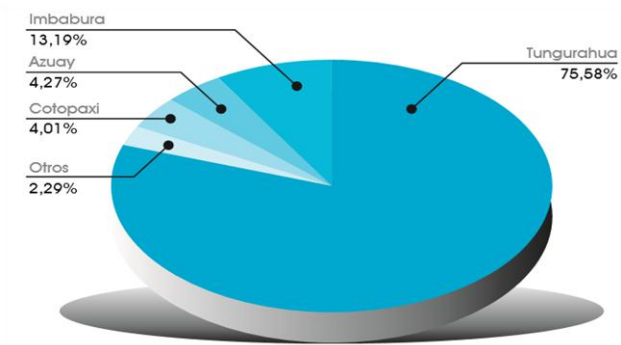


Gráfico 1-1: Principales provincias productoras de cuero en Ecuador.

Fuente: (Salinas, 2014, p. 23) Asociación Nacional de Curtidores del Ecuador.

1.2.4 Límites máximos permisible para descarga de cromo hexavalente

1.2.4.1 Legislación ecuatoriana

En el Anexo 1 del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente de Ecuador, la tabla 8 menciona un límite máximo permisible de cromo hexavalente en agua para uso pecuario de 1 mg/L, la tabla 11 menciona un límite máximo permisible para cromo hexavalente en vertidos al alcantarillado de 0.5 mg/L y la tabla 12 menciona un límite máximo permisible de cromo hexavalente para vertidos en cuerpos de agua dulce de 0.5 mg/L. (TULSMA, 2015, pp. 316-333).

1.2.4.2 Legislación Sudamericana

Argentina en su Decreto 674/89/ Disposición 79179/90-Nación, Anexo A para límites permitidos en el vertido a colectora cloacal, conducto pluvial y curso de agua, establece un límite máximo permisible para cromo hexavalente de 0.2 mg/L.

Colombia, en su resolución No 0631 de 2015 del Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible, dentro del ámbito de descargas a cuerpos de agua superficiales y sistemas de alcantarillado, para los procesos de elaboración de artículos de piel, curtido y adobo de pieles establece un límite máximo permisible para cromo hexavalente de 1.5 mg/L, superior al límite máximo permisible en Ecuador.

Por el contrario, Perú en su Decreto Supremo No 003-2002-PRODUCE sobre límites máximos permisibles y valores referenciales para las actividades industriales de cemento, cerveza,

curtiembre y papel, establece un límite máximo permisible de cromo hexavalente para descarga al alcantarillado de 0.4 mg/L y para descarga a cuerpos de agua superficiales de 0.3 mg/L, valores menores a los establecidos en la legislación ecuatoriana.

1.2.5 Tratamientos convencionales para Cr VI en aguas residuales de curtiembre

1.2.5.1 Intercambio iónico

Una de las principales aplicaciones del intercambio iónico es la recuperación de metales, un claro ejemplo es la recuperación de Cromo hexavalente en efluentes residuales. El método consiste en pasar el agua residual por un cambiador catiónico que se encarga de eliminar metales extraños como hierro, níquel, cobre o cromo trivalente, el cromo hexavalente (Cr^{+6}) presente en forma de CrO_4^{2-} es eliminado por un cambiador aniónico que como resultado nos da agua desmineralizada apta para el uso. El cromo hexavalente se recupera regenerando el cambiador aniónico con hidróxido sódico, esto libera CrO_4Na_2 que a su vez pasa por un cambiador catiónico el cual reemplaza el sodio por hidrogeno dando como resultado una solución ácida (CrO_4H_2) que se puede recuperar. (Weber, 2003, p. 301)

Este método puede recuperar cromo hexavalente de aguas residuales con una concentración no mayor a 119 g CrO_4^{2-} / litro, siempre y cuando no existan materiales que puedan dañar o impurificar las resinas usadas en el proceso.

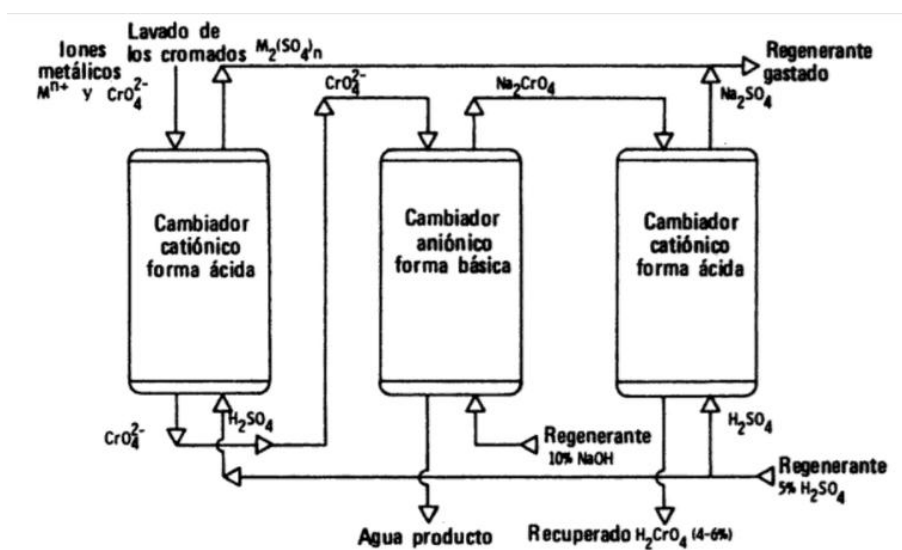


Figura 1-1: Diagrama de tratamiento de agua residual por intercambio iónico.

Fuente: (Weber, 2003, p. 302)

1.2.5.2 Reducción fotocatalizada

El fenómeno fotocatalítico se basa en la excitación de un sólido semiconductor como el TiO_2 , ZnO , CdS , ZnS , entre otros por medio de irradiación de luz ultravioleta (UV- visible). Esta radiación promueve electrones desde la banda de valencia hasta la banda de conducción, generando así una zona reductora (exceso de electrones) en la banda de conducción y una zona oxidante (deficiencia de electrones) en la banda de valencia (Tapia, et al., 2002, p. 469)

Una vez que el catalizador ha llegado a su estado de excitación los electrones de la banda conductora que están en exceso se pueden transferir a un compuesto receptor de electrones como lo es el Cr^{+6} (cromo hexavalente), provocando su reducción. En su investigación Tapia, et al (2002, p. 469) usó TiO_2 como catalizador para reducir 50 ml de Cr^{+6} en concentración de 100 mg/L, obteniendo como resultado un 97.8 % de reducción de Cr^{+6} en un sistema modelo y un 81.3 % de reducción de Cr^{+6} en un efluente de curtiembre.

1.2.5.3 Electrocoagulación

La electrocoagulación es un proceso que consiste en la creación de flóculos de un hidróxido metálico (generalmente hierro) por disolución de electrodos de un ánodo soluble (ver Figura 5-1), los cuales reaccionan con cromo hexavalente para generar cromo trivalente. (El - Taweel, et al., 2015, p. 183)

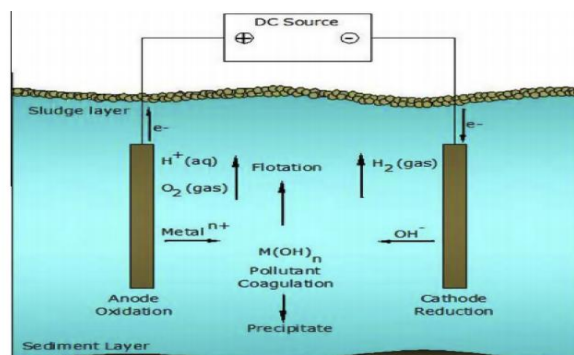
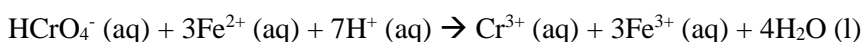


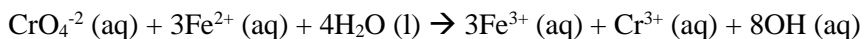
Figura 2-1: Diagrama de tratamiento de agua residual por electrocoagulación.

Fuente: (El - Taweel, et al., 2015, p. 184)

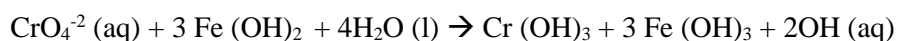
A un pH de entre 0.9 y 6.5 la reacción que ocurre es la siguiente:



A un pH de entre 6.5 y 7.5 la reacción que ocurre es la siguiente:



A un pH mayor a 7.5 la reacción que ocurre es la siguiente:



1.2.6 Tratamientos biológicos para Cr VI en agua residual de curtiembre

1.2.6.1 Fitorremediación

La fitorremediación es el uso de especies vegetales para la transformación, remoción y acumulación de contaminantes en suelo y agua, este proceso es llevado a cabo in situ y su grado de efectividad depende de factores como la disponibilidad del contaminante y el nivel de contaminación

Según Kamnev y Van der Lelie, 2000 citados en (Beltrán & Gómez, 2016, p. 187) *Brassica sp*, *Alyssum sp*, *Arabidopsis sp* y *Petrisis sp* son especies implicadas en la fitorremediación de cromo y por tanto pueden ser usadas en la remediación de ambientes contaminados.

1.2.6.2 Biorremediación

La biorremediación es todo proceso en el cual los microorganismos reciclan materia orgánica y separan iones inorgánicos como un proceso natural bajo las condiciones adecuadas de oxígeno residual, nutrientes y contacto con el sustrato (Castillo Rodríguez, et al., 2005, p. 366).

En cuanto a las aguas residuales de curtiembre, los microorganismos son capaces de remover o detoxificar el cromo hexavalente mediante diversos mecanismos activos y pasivos, además son capaces de sedimentar y solubilizar el cromo trivalente. (Benitez, 2011, p. 29)

Dhal et al, 2013 citado en (Beltrán & Gómez, 2016, p. 180) menciona que *Pseudomonas sp*, *Micrococcus sp*, *Bacillus sp*, *Achromobacter sp*, *Microbacterium sp*, *Arthrobacter sp*, *Vogesella indigofera* y *Corynebacterium sp*, están implicados en la biorremediación de cromo hexavalente, y por tanto pueden ser usados en remediación de medios contaminados.

En el caso de hongos y levaduras, Gutiérrez et al. Citado en (Benitez, 2011, p. 30) reporta que las especies *Candida sp*, *Pichia sp*, *Aspergillus sp*, *Rhizopus sp* y *Penicillium sp* son capaces de transformar cromo hexavalente en especies reducidas menos tóxicas e incluso han sido implementadas en tratamientos biológicos para la descontaminación de efluentes industriales.

1.2.7 Mecanismos microbianos de resistencia a metales pesados

Los microorganismos responden a la presencia de metales pesados usando diferentes mecanismos de adaptación, según Rajendran, et al, (2003, p. 938) estos mecanismos pueden o no ser de origen enzimático.

El microorganismo puede restringir la entrada del metal a la célula creando una barrera de permeabilidad para proteger sus componentes celulares más sensibles, como lo hace *E.coli* en su mecanismo de exclusión de Cu II. *Pseudomonas sp* por su parte protege sus componentes celulares mediante la unión del metal a la membrana celular, este mecanismo es eficiente solo a bajas concentraciones debido a la rápida saturación de las zonas de unión y en *Pseudomonas sp* está codificado por los genes copA, copB, copC y copD (Bruins, et al., 2000, p. 200).

Algunos microorganismos resisten a elevadas concentraciones de metales pesados reduciendo el nivel de toxicidad de los mismos, *Pseudomonas fluorescens* o *Enterobacter cloacae* por ejemplo son capaces de reducir CrO_4^{2-} a $\text{Cr}(\text{OH})_3$ y *Alcaligenes faecalis* es capaz de transformar el AsO_2^- en AsO_4^{3-} (Rajendran, et al., 2003, p. 937).

De acuerdo a Bruins, et al, (2000, p. 203) existen también mecanismos para el secuestro de metales los cuales pueden ocurrir internamente como en el caso de *Synechococcus sp* que produce metalotioneina para unirse a metales como Cd II y Zn II y posteriormente secuestrarlos o externamente como en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* que excreta grandes cantidades de glutatión para secuestrar Ni II y reducir la absorción del mismo.

Marrero-Coto et al, (2010, p. 68) menciona que los microorganismos disminuyen la acumulación de metales mediante un sistema de transporte activo hacia el exterior de la célula (Ver Tabla 2-1), también menciona que una célula para un mismo componente puede presentar mecanismos bilaterales como en el caso de *Escherichia coli* que posee mecanismos de entrada para iones Zn II y mecanismos de salida para el exceso.

Tabla 2-1: Sistemas bacterianos para expulsión de iones inorgánicos tóxicos.

Gen/operón	Iones transportados	Mecanismo de expulsión
arsAB	AsO ₂ ⁻	ATPasa
arsB	AsO ₂ ⁻	Quimiosmótico
cada	Cd ²⁺	ATPasa tipo P
chrA	CrO ₄ ⁻²	Quimiosmótico
copA	Cu ⁺	ATPasa tipo P
cusCFBA	Cu ⁺	Quimiosmótico, RND
CzcCBA	Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺	Quimiosmótico, RND
czcD	Cd ²⁺	Quimiosmótico, CDF
nccCBA	Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Cd ²⁺	Quimiosmótico, RND
pbrA	Pb ²⁺	ATPasa tipo P
silCBA	Ag ⁺	Quimiosmótico, RND
silP	Ag ⁺	ATPasa tipo P
zitA	Zn ²⁺	ATPasa tipo P
zitB	Zn ²⁺	Quimiosmótico, CDF

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

Fuente: (Cervantes, et al., 2006, p. 204)

Según Cervantes et al, (2006, p. 205) el sistema de expulsión para cromato (CrO₄⁻²) fue identificado en los plásmidos que codifican la proteína chrA en *Pseudomonas arruginosa* y *C. metallidurans*, la misma que expulsa el cromato del citoplasma mediante un proceso quimiosmótico.

1.2.8 Mecanismos bioquímicos para la biorremediación de metales pesados

1.2.8.1 Bioacumulación

En los microorganismos, el proceso de bioacumulación inicia con la unión del metal a la superficie celular mediante mecanismos electrostáticos, fuerzas de Van der Waals o interacciones redox (Rajendran, et al., 2003, p. 937), una vez que ocurre la unión se activa un mecanismo que internaliza el metal generando un gasto energético a través del sistema H⁺ - ATPasa y finalmente cuando el metal logra llegar al citoplasma, este es secuestrado por un grupo de proteínas llamadas metalotioneínas. En el caso de los hongos el metal es compartimentado dentro de una vacuola (Marrero, et al., 2010, p. 73)

Ahemad y Malik (2012, p. 18) demostraron en su estudio una capacidad de acumulación máxima de Zn de 29 mg g⁻¹ de peso celular seco y de Cu de 25 mg g⁻¹ de peso celular seco, en tres cepas bacterianas aisladas de suelo agrícola regado con aguas residuales industriales y domésticas.

Para cromo hexavalente, Srinath et al, (2002, p. 431) demostró que las cepas *Bacillus circulans* y *Bacillus megaterium* son capaces de acumular 34.5 mg (CrVI) g⁻¹ y 32 mg (CrVI) g⁻¹ de peso celular seco respectivamente a partir de una concentración inicial de 50 mg /Cr VI l⁻¹.

1.2.8.2 Transformación de valencia

Según Garbisu et al, 2003 citado en (Beltrán & Gómez, 2016, p. 177) los microorganismos tienen la capacidad de reducir un metal enzimáticamente mediante procesos metabólicos que no están relacionados a la asimilación del metal, logrando cambiar su valencia y disminuir su toxicidad (Ver Figura 3-1).

En el caso del cromo hexavalente, la reducción a cromo trivalente ocurre gracias a la acción de ciertas reductasas como la cromato reductasa caracterizada en *Pseudomonas ambigua* (Marrero, et al., 2010, p. 69).

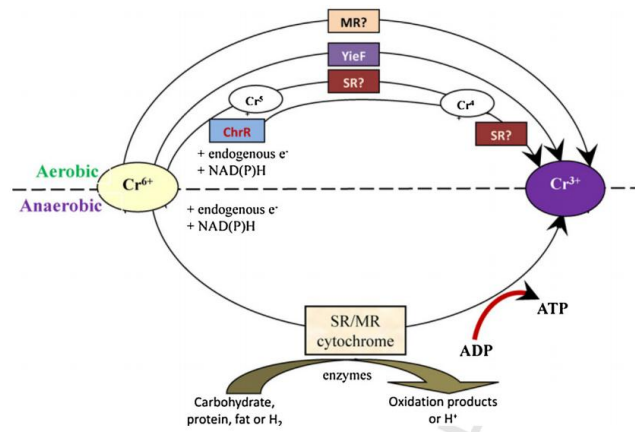


Figura 3-1: Mecanismo de reducción de cromo hexavalente.

Fuente: (Pradhan, et al., 2017, p. 10)

De acuerdo a Wang y Shen (1995, p. 160), son varios los microorganismos capaces de reducir Cr VI a Cr III, de los cuales la mayoría son anaerobios facultativos (Ver Tabla 3-1).

Tabla 3-1: Microorganismos que reducen Cr VI a Cr III.

MICROORGANISMO	SUSTRATO	CONDICIÓN REDOX
<i>Achromobacter eurydice</i>	Acetato, glucosa	Anaerobia
<i>Eromonas dechromotica</i>	Galactosa, manosa, sacarosa, fructosa, lactosa	Anaerobia
<i>Bacillus cereus</i>	Acetato, glucosa	Anaerobia
<i>Bacillus subtilis</i>	Acetato, glucosa	Anaerobia
<i>Micrococcus roseus</i>	Acetato, glucosa	Anaerobia
<i>Escherichia coli</i>	Acetato	Anaerobia
<i>Pseudomonas ambigua</i>	Caldo nutritivo	Aerobia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Acetato, glucosa	Anaerobia
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Glucosa	Aerobia
<i>Pseudomonas dechromaticans</i>	Peptona, glucosa	Anaerobia

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

Fuente: (Wang & Shen, 1995, p. 160)

1.2.8.3 Precipitación química extracelular

Es un mecanismo no enzimático el cual tiene lugar cuando los microorganismos secretan iones sulfatos, fosfatos y carbonatos que precipitan iones metálicos como una forma de inmovilización del metal (Beltrán & Gómez, 2016, p. 178).

Algunos microorganismos son capaces de excretar moléculas acomplejantes de hierro denominadas sideroforos, los cuales suelen tener afinidad por los metales pesados como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* que presenta especificidad para Cd, por lo que puede ser usada en procesos de biolixiviación y recuperación del metal Gilis et al, citado en (Beltrán & Gómez, 2016, p. 178)

Garbisu et al, citado en (Beltrán & Gómez, 2016, p. 179) menciona que las bacterias reductoras de sulfato son capaces de convertir el sulfato en sulfuro de hidrógeno, el cual reacciona con los metales para formar sulfuros metálicos insolubles como el sulfuro de cadmio.

1.2.8.4 Mecanismo simbiótico

Según lo reportado por Jing et al, 2007 y Chaudhry et al, 2005 citados en (Beltrán & Gómez, 2016, p. 179) la posibilidad de combinar microorganismos con especies vegetales puede ser beneficioso para el proceso de remediación, pues el microorganismo aumenta la disponibilidad del contaminante y la planta aporta con su remoción.

El mecanismo simbiótico también es beneficioso para el crecimiento tanto de la planta como el microorganismo pues la planta provee de nutrientes y el microorganismo aumenta el desarrollo de la raíz aumentando su capacidad de acumulación según Wu et al, 2010 citado en (Beltrán & Gómez, 2016, p. 179)

De acuerdo a González-Chávez (2005, p. 33) las micorrizas: ectomicorrizas (species arbóreas y actinomicetes) y micorriza ericoide (miembros de la familia Ericaceae y ascomicetes) son de gran importancia para la remediación de ambientes contaminados con elementos potencialmente tóxicos como metales pesados y derivados de petróleo.

1.2.9 Ralstonia pickettii

González-Chávez (2005, p. 32) menciona que las bacterias aisladas con mayor frecuencia de ambientes contaminados por el hombre con elementos potencialmente tóxicos como metales pesados y derivados de petróleo son: *Burkholderia pickettii*, *Burkholderia solanacearum* y *Alcaligenes eutrophus*, por el contrario en ambientes contaminados naturalmente destaca a los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter*.

Ralstonia es un género recientemente designado para miembros anteriores del género *Burkholderia*. *Ralstonia pickettii* es una bacteria gram negativa, no fermentativa, oxidasa positiva y ubicua en el ambiente. Es un organismo oligotrófico capaz de adaptarse y crecer en medios con una concentración muy baja de nutrientes, además varias investigaciones han demostrado su capacidad para degradar varios contaminantes como fenol, benceno, tolueno, entre otros (Ver Tabla 4-1). (M.P. Ryan, et al., 2007, p. 754)

De acuerdo a la investigación de Xie et al, (2010, pp. 4062-4063) el rango de temperatura en la que *R. pickettii* se desarrolla es de 20 a 45 °C, sin embargo presenta mayor crecimiento entre 35 y 37 °C, en cuanto al pH, el rango de desarrollo va de 4 a 10 siendo a pH neutro donde se observa mayor crecimiento. Xie et al, también analizó posibles fuentes de carbono para el desarrollo de *R. pickettii* evidenciado crecimiento en sacarosa, D-Maltosa, D-Threalosa, D-Celobiosa, D-Manosa, D-Fructosa, D-Sorbitol, D-Manitol, D-Galactosa, D-Serina, Pectina, Bromato de sodio, entre otros.

Mijnendonckx et al, (2013, p. 355) evaluó la resistencia de la cepa ATCC 27511 *Ralstonia pickettii* a metales pesados obteniendo los siguientes resultados en medio líquido: 0.0010 mM para Ag⁺, 0.00130 mM para Hg²⁺, 0.25 mM para Cd²⁺, 3.125 mM para Co²⁺, 3 mM para Zn²⁺, 0.75 mM para Cu²⁺, y 1 mM para Ni²⁺.

Tabla 4-1: Compuestos tóxicos degradados por *R. pickettii*.

SUSTRATO	GENES RESPONSABLES
Benceno	Ruta tbu
Meta-cresol	Ruta tbu
Orto-cresol	Ruta tbu
Para-cresol	Ruta tbu
1,4-dioxano	Ruta tbu
Nitrobenceno	Ruta tbu, locus pnb
N-nitrosodimetilamina	Ruta tbu
Fenol	Ruta tbu
Tolueno	Ruta tbu
Pentaclorofenol	No conocido
Quinolina	No conocido

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

Fuente: (M.P. Ryan, et al., 2007, p. 755)

Ralstonia pickettii posee un regulón denominado “Ruta tbu” que codifica las enzimas encargadas del catabolismo del benceno, tolueno e hidrocarburos alquilaromáticos (Kahng, et al., 2000, p. 1232) y constituye el mecanismo más importante para la degradación de compuestos tóxicos de naturaleza orgánica (Ver Tabla 4-1).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Tipo y diseño de la investigación

La investigación es de tipo exploratorio con diseño experimental, pues la manipulación de variables mediante metodologías conocidas permitirá aceptar o rechazar una hipótesis.

Diseño experimental

El diseño experimental de la presente investigación fue unifactorial con n tratamientos.

Tabla 1-2: Diseño experimental de la investigación.

CONCENTRACIÓN FINAL DE Cr VI (mg/L)				
UNIDAD DE ANÁLISIS	REPETICIONES	TIEMPO DE INCUBACIÓN (HORAS)		
		24	48	72
UA 1	3	-	-	-
UA 2	3	-	-	-
UA 3	3	-	-	-

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

2.2 Unidad de análisis

Concentración de cromo hexavalente (mg/L).

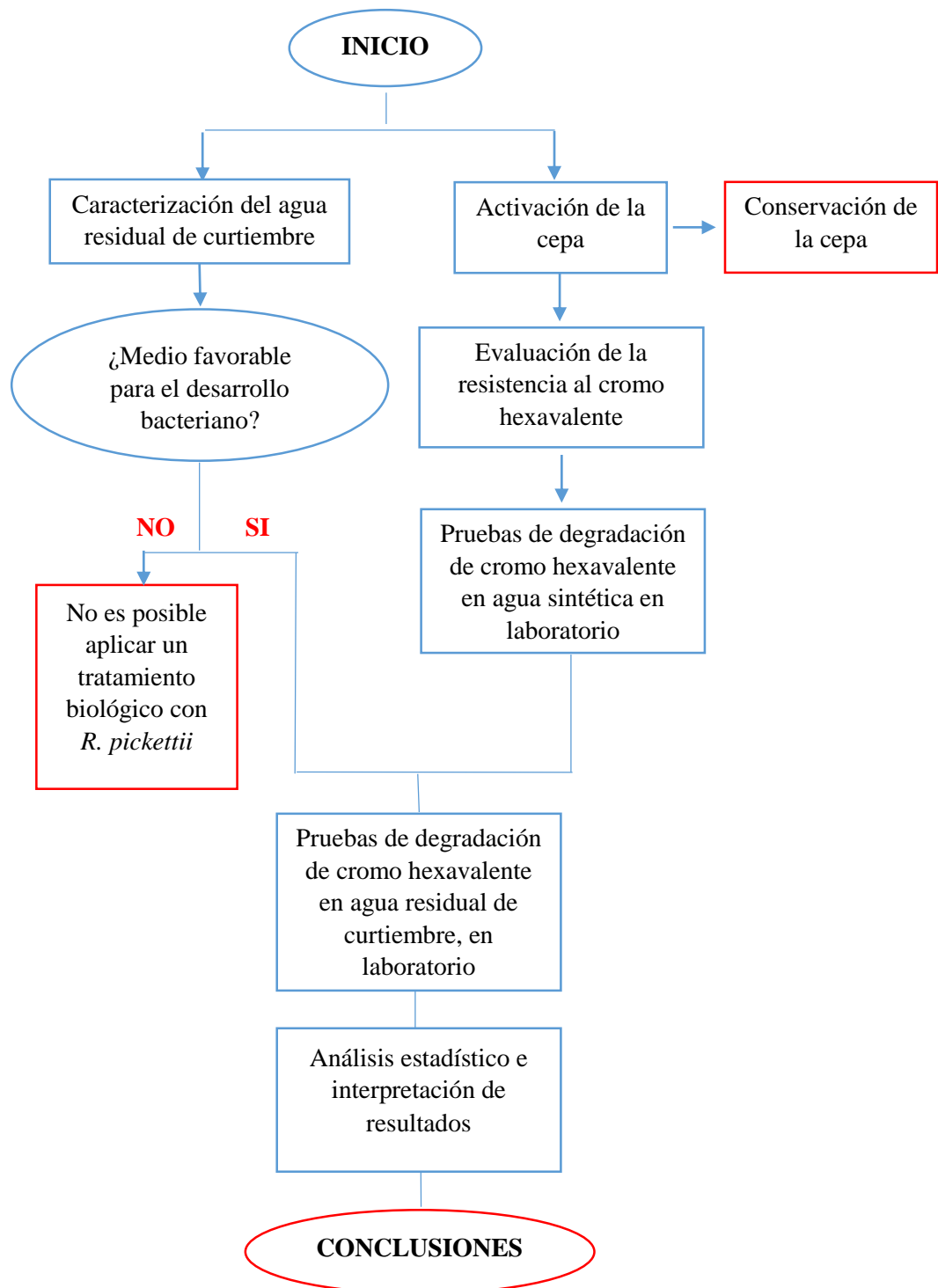
2.3 Población de estudio

Agua residual proveniente de curtiembre.

2.4 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se compone de 30 ensayos de 100 ml cada uno, dando un total de 3000 ml por curtiembre.

2.5 Diagrama de procedimiento



2.6 Etapas de la investigación

2.6.1 Preparación de medios de cultivo

- **Agar nutritivo:** Se utilizó para la siembra en placa de *R. pickettii*, para su preparación se siguieron las indicaciones del fabricante Difco (Ver Anexo A).
- **Caldo nutritivo:** Se utilizó para la siembra en medio líquido de *R. pickettii*, para su preparación se siguieron las indicaciones del fabricante Difco (Ver Anexo B).
- **Agar PCA (Plate Count Aar):** De acuerdo al fabricante Difco, el agar PCA está diseñado para el conteo de bacterias aerobias en agua, agua residual y alimentos, por lo tanto se utilizó para el conteo de heterótrofos en las muestras de agua residual de curtido. Para su preparación se siguieron las indicaciones del fabricante (Ver Anexo C).

2.6.2 Preparación de medios de cultivo suplementados

Tanto el medio sólido (agar nutritivo) como el medio líquido (caldo nutritivo) se suplementaron con soluciones de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) para alcanzar las concentraciones de cromo hexavalente necesarias. Para la evaluación de la resistencia al Cr VI se prepararon 50, 100, 150, 200 y 250 mg/L de dicromato de potasio y para las pruebas de gradación en agua sintética se prepararon 5, 10 y 15 mg/L de dicromato de potasio.

2.6.3 Activación de la cepa de *Ralstonia pickettii*

La activación de *R. pickettii* se realizó en placas de agar nutritivo, siguiendo las instrucciones del distribuidor para la activación de formatos KWIK-STIK (Ver Anexo A), las placas se incubaron durante 48 horas a 35°C.

2.6.4 Elaboración del cultivo overnight

Para elaborar un cultivo overnight se sembró la bacteria en caldo nutritivo y se incubó a 35 °C (aproximadamente 8 horas), posteriormente se comparó la turbidez del cultivo con el nefelómetro

número 0.5 de la escala de McFarland (Ver Figura 1-2) equivalente a aproximadamente 1×10^8 UFC por mililitro. (Pasterán & Galas, 2008, p. 34)

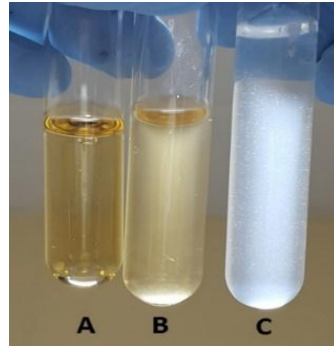


Figura 1-2: Cultivo overnight.

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

A: Blanco sin inóculo, B: Cultivo overnight, C: 0.5 McFarland

2.6.5 Conservación de la cepa

2.6.5.1 Subcultivos

Para la realización de los subcultivos se tomó una muestra del cultivo principal con la ayuda de un asa de siembra y se realizó un estriado de tres zonas en una placa fresca de agar nutritivo, posteriormente se selló con parafilm y se incubó a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los subcultivos se realizaron cada 15 días, tiempo en el cual se evidenció deshidratación del medio y pérdida de grosor. (Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, 2016, p. 21)

2.6.5.2 Congelación ordinaria

Para la congelación ordinaria se tomó una muestra del cultivo principal de *Ralstonia pickettii* y se realizó un cultivo overnight en caldo nutritivo el cual se comparó con el estándar 0.5 de la escala de McFarland aproximadamente 1×10^8 UFC/ml (Pasterán & Galas, 2008, p. 39), una vez alcanzada la concentración requerida se tomó 0.2 ml de cultivo y se inocularon en tubos eppendorf de 2 ml con un agente preservante al 30% (0.7 ml de caldo nutritivo y 0.3 ml de glicerol), por último se congeló la cepa a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ver Anexo E) (Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, 2016, p. 23)

2.6.6 Caracterización del agua residual de curtiembre

2.6.6.1 Muestreo

Para cada curtiembre se tomó una muestra de tipo simple, siguiendo los lineamientos de la NTE INEN 2176:1998. Tomando las debidas precauciones y con el equipo de protección personal adecuado se realizó tres enjuagues del envase con el agua residual, posteriormente se llenó el envase por completo, se tapó herméticamente, se rotuló y finalmente se refrigeró hasta su análisis en el laboratorio de acuerdo a la NTE INEN 2169:2013.

Los envases que se usaron para el muestreo fueron de plástico y previamente lavados con un detergente libre de fosfatos de acuerdo a la NTE I.NEN 2169:2013.

2.6.6.2 Caracterización de parámetros físico-químicos y microbiológicos

La caracterización del agua residual se realizó durante tres días diferentes de producción en cada curtiembre para evaluar posibles variaciones en los valores de los parámetros analizados.

- Temperatura: Se midió insitu con un termómetro infrarrojo digital marca One Technology, modelo GM320 con un rango de medición de -50 °C a 380 °C.
- pH y Conductividad: Se midieron exsitu, en el laboratorio de calidad del agua de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, la muestra se dejó reposar hasta que alcanzara la temperatura ambiente luego de ser transportada a 4°C (aproximadamente), se transfirieron 100 ml de la muestra a un envase limpio y se procedió a la medición en un multímetro marca Consort modelo C562.
- Cromo hexavalente: Se realizó en el laboratorio de calidad del agua de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, mediante el método de 1,5-Difenil-carbohidracida usando el reactivo de la marca HACH, en un Fotómetro marca HACH modelo DR 2800 (Ver Anexo B)
- Conteo de heterótrofos: Se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH usando el método de diluciones seriadas, en placas de agar PCA se sembró hasta la dilución 10^{-5} , se incubaron a 35°C y finalmente a las 72 horas se realizó el conteo, debido a que en las primeras 48 no se observó crecimiento. (Aquiahuatl Ramos & Pérez Chabela, 2004, pp. 68-69)

2.6.7 Evaluación de resistencia al cromo hexavalente

La evaluación de la concentración mínima inhibitoria de cromo hexavalente se llevó a cabo en placas de agar nutritivo suplementado con dicromato de potasio en las concentraciones: 50, 100, 150, 200 y 250 mg/L, las cuales están dentro del rango de resistencia de otros géneros bacterianos como *Pseudomonas* o *Alcaligenes* (Moraga , et al., 2003, pp. 93-94)

Para cada concentración se sembraron dos placas usando una técnica de punción para obtener colonias separadas y diferenciables, además se sembraron dos placas de control con agar nutritivo sin suplementar y se incubaron a 35°C por 48 horas.

2.6.8 Pruebas de degradación de cromo hexavalente en agua sintetizada en laboratorio

Para evaluar la capacidad de degradación de *R.pickettii* de cromo hexavalente se utilizó caldo nutritivo suplementado con dicromato de potasio (Hernández, et al., 2016, p. 68) en concentraciones de 5,10 y 15 mg/L, las cuales son mayores al límite máximo permitido por la legislación ecuatoriana para descargas al sistema de alcantarillado o cuerpos de agua, por lo tanto requieren tratamiento.

Se establecieron 3 unidades de análisis con 3 repeticiones para garantizar la fiabilidad del ensayo (Ver Figura 2-2), las unidades de análisis fueron inoculadas a partir de un cultivo overnight en diferentes concentraciones (Ver Tabla 1-2) y se incubaron a 35°C por 72 horas. Además se realizó un blanco sin inóculo el cual se incubó bajo las mismas condiciones que las unidades de análisis.

Transcurridas las 72 horas se tomaron muestras de 10 ml en tubos de ensayo, se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos (Hernández, et al., 2016, p. 68) y se midió la concentración de cromo hexavalente.



Figura 2-2: Pruebas de degradación de Cr VI en agua sintética

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

Tabla 2-2: Diseño experimental para las pruebas de degradación de Cr VI en agua sintética

Unidad de análisis	Repetición	Concentración inicial de cromo hexavalente (mg/L)		
Unidad de análisis 1 (10^8 UFC)	3	5	10	15
Unidad de análisis 2 (2×10^8 UFC)	3			
Unidad de análisis 3 (3×10^8 UFC)	3			
Blanco (sin biomasa)				

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

2.6.9 Pruebas de degradación de cromo hexavalente en agua residual de curtiembre

Se establecieron 3 unidades de análisis con 3 repeticiones para garantizar la fiabilidad del ensayo, las unidades de análisis se inocularon a partir de un cultivo overnight en diferentes concentraciones (Ver Tabla 2-2) y se incubaron a 35°C. Además se realizó un blanco sin inóculo el cual se incubó bajo las mismas condiciones que las unidades de análisis.

- **Unidad de análisis 1:** 80% de agua residual, 10 % de nutrientes (caldo nutritivo) y 10% de biomasa.
- **Unidad de análisis 2:** 75% de agua residual, 10 % de nutrientes (caldo nutritivo) y 15% de biomasa.
- **Unidad de análisis 3:** 70% de agua residual, 10 % de nutrientes (caldo nutritivo) y 20% de biomasa,

A las 24, 48 y 72 horas se tomaron muestras de 10 ml en tubos de ensayo, se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos (Hernández, et al., 2016, p. 68) y se midió la concentración de cromo hexavalente.

Tabla 3-2: Diseño experimental para las pruebas de degradación de Cr VI en agua residual.

Unidad de análisis	Repetición	Tiempo de incubación (horas)		
Unidad de análisis 1	3	24	48	72
Unidad de análisis 2	3			
Unidad de análisis 3	3			
Blanco sin inóculo				

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

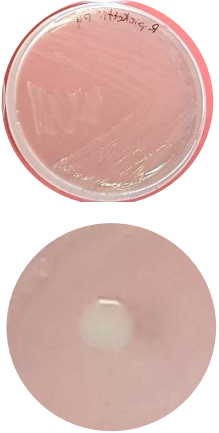
CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Activación de la cepa de *Ralstonia pickettii*

El desarrollo de la cepa de *R. pickettii* con número de referencia ATCC 700591 y viabilidad >1000 UFC por pallet (Ver Anexo C), tuvo lugar dentro de 72 horas a 35 °C en agar nutritivo. Posteriormente se evaluó su estabilidad morfológica comparando sus características macroscópicas con las establecidas en el certificado de análisis emitido por el distribuidor Microbiológicos. (Ver Tabla 1-3)

Tabla 1-3: Estabilidad morfológica de la cepa ATCC 700591

Cepa	ATCC 700591	
	Descripción	Fotografía
Borde o margen	Entero	
Frente a la luz	Brillante	
Forma	Circular, aproximadamente a los 8 días e presenta irregular	
Color	Blanco grisáceo	
Tamaño	Pequeño	
Superficie	Lisa	
Consistencia	Cremosa	
Pigmentación o cromogénesis	No presenta	
Medio, T °C	Agar nutritivo, 35°C	

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

La estabilidad morfológica se mantuvo por aproximadamente 15 días, pasado este tiempo las colonias presentaron coloración amarillenta en el centro y se evidenció deshidratación del medio, por lo que se prepararon nuevos cultivos en medio fresco.

El Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (2016, p. 20) menciona tiempos de conservación por el método de subcultivos de 1 semana en géneros como *Acinetobacter*, *Actinobacillus* o *Lactobacillus* hasta 8 meses en *Streptomyces* y *Clostridium*. El tiempo de conservación de *R. pickettii* de aproximadamente 15 días, de acuerdo a Berger, 1970 citado en (Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, 2016, p. 21) pudo deberse a la utilización de medios de cultivo ricos en nutrientes, lo que ocasiona que el metabolismo microbiano se acelere y el medio sea consumido en poco tiempo, considerando que este es un género oligotrófico.

3.2 Caracterización del agua residual de curtiembre

Tabla 2-3: Caracterización fisicoquímica y microbiológica del agua residual.

CURTIEMBRE	PARÁMETRO	MUESTREO 1	MUESTREO 2	MUESTREO 3	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE (TULAS)
Curtiembre A	Temperatura (°C)	15.7	16.1	15.2	<40
	pH (adimensional)	4.41	3.90	4.27	5-9
	Conductividad (mS/cm)	19.9	22.9	23.7	-
	Concentración de Cr VI (mg/L)	0.14	0.20	0.18	0.5
	Conteo microbiano (UFC)	0	0	0	-
Curtiembre B	Temperatura (°C)	15.9	15.5	15.3	<40
	pH (adimensional)	3.49	4.21	4.11	5-9
	Conductividad (mS/cm)	16.8	17.1	16.2	-
	Concentración de Cr VI (mg/L)	0.16	0.22	0.21	0.5
	Conteo microbiano (UFC)	0	0	0	-
Curtiembre C	Temperatura (°C)	15.6	16.1	15.8	<40
	pH (adimensional)	4.39	4.12	3.97	5-9
	Conductividad (mS/cm)	11.2	9.45	8.61	-
	Concentración de Cr VI (mg/L)	0.10	0.13	0.09	0.5
	Conteo microbiano (UFC/ml)	10500	450	600	-

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

- **Temperatura:** Los valores de la temperatura en las curtiembres A, B y C se encuentran en el rango adecuado para el desarrollo de microorganismos mesófilos (Castillo Rodríguez, et al., 2005, p. 383), sin embargo, de acuerdo a la investigación de Xie et al, (2010, p. 4062) los valores de 15.2 a 16.1 °C obtenidos en los análisis se encuentran por debajo del mínimo requerido de 20 °C para el correcto desarrollo de *R. pickettii*, por lo que para un posible tratamiento de agua residual de curtiembre se debería adecuar las condiciones de temperatura para obtener resultados satisfactorios.
- **pH:** Los valores de pH obtenidos en las curtiembres A, B y C nos indican que el agua residual posee las características de un medio óptimo para el crecimiento de acidófilos los cuales se encuentran en pH de 1 a 5 según (Castillo Rodríguez, et al., 2005, p. 386). En su investigación Xie, et al (2010, p. 4062) reporta un valor mínimo de pH para el crecimiento de *R. pickettii* de 4, por lo tanto su uso en un tratamiento de agua residual de curtido es posible, sin embargo deben ser controlados los valores de pH como el de 3.49 obtenido en el primer muestreo de la curtiembre B.

De acuerdo a Zarate, et al, (1993, p. 13), los valores de pH en la etapa de curtido al cromo varían entre 4 y 6, pues un medio ácido permite la correcta adhesión del cromo en la piel. Munz, et al (2008, p. 8613) reportó valores de 5.8 a 7.5 en agua residual de curtiembre, en otro estudio Álvarez, et al (2004, p. 77), reportó valores de pH en agua residual del curtido entre 3.8 y 4.2, similares a los obtenidos en la presente investigación de 3.49 a 4.41, los cuales están dentro del rango mencionado por Zarate, et al (1993, p. 13).

- **Conductividad:** De acuerdo a Álvarez, et al (2004, p. 78), la conductividad eléctrica indica la presencia de ciertos iones como: Na⁺⁺, Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺, provenientes de productos químicos usados en los procesos de curtido, en su investigación obtuvo valores de conductividad eléctrica de aproximadamente 10 mS/cm en efluentes del curtido, los cuales son similares a los reportados por Munz, et al (2008, p. 8613) de 12 mS/cm y los obtenidos en el análisis de la curtiembre C en la presente investigación de entre 8.61 y 11.2 mS/cm. Los valores en las curtiembres A van de 19.9 a 23.7 mS/cm y en la curtiembre B de 16.2 a 17.1 mS/cm, lo que nos indica mayor presencia de iones, posiblemente debido a la cantidad de pieles tratadas que requieren mayor cantidad de insumos.
- **Cromo hexavalente:** En la concentración de cromo hexavalente de las curtiembres A, B y C se contemplan pequeñas diferencias, sin embargo ningún valor supera el límite máximo permisible para descargas en alcantarillado público de 0.5 mg/L de Cr VI establecido en el Anexo 1 del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del

Ambiente de Ecuador (TULSMA, 2015, pp. 313-333), por lo que en teoría son aguas residuales que no necesitan tratamiento en cuanto a cromo hexavalente se refiere.

Otiniano, et al (2007, p. 35) es su investigación evalúa la degradación de Cr VI en una curtiembre, reportando un valor de 0.37 mg/L en la caracterización del agua residual, valor similar a los reportados en las curtiembres A y B analizadas en la presente investigación y que de acuerdo a la legislación ecuatoriana no requiere tratamiento.

En su investigación Shakoori, et al (2000, p. 349) reporta valores similares que van desde 0.025 a 0.41 mg/l de Cr VI en agua residual de curtiembre.

- **Conteo de heterótrofos:** En el conteo de las curtiembre A y B no se obtuvo crecimiento, lo que nos indica a breves rasgos que existe un interferente de crecimiento microbiano, el cual podría ser de origen químico, pues es común que para un proceso de recuperación de cromo se añadan agentes químicos como el hidróxido de sodio (Agudelo & Gutiérrez , 2007, p. 243) en los tanques de almacenamiento de agua residual. En procesos de curtido industrializados también se suele usar resinas y fungicidas para garantizar la buena calidad del cuero, lo cual genera un ambiente tóxico para el desarrollo de los microorganismos, impidiendo el uso de tratamientos biológicos como la biorremediación.

La curtiembre C está diseñada a pequeña escala con fines educativos en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, al no ser un proceso industrializado no requiere el uso de resinas o fungicidas, lo cual explica los valores obtenidos de UFC en los diferentes conteos realizados.

El valor de 10500 UFC/ml en el primer conteo difiere mucho de los valores obtenidos en los conteos 2 y 3, esto puede deberse a la variación en los procesos usados para el curtido de pieles, pues la curtiembre C es usada por varios grupos de estudiantes los cuales pudieron haber alterado de alguna forma el método planteado para el curtido. Sin embargo los valores obtenidos de UFC incluso en el primer muestreo son bajos en comparación a valores obtenidos en estudios como el de Shakoori, et al (2000, p. 349), en el cual se reportan valores de entre 48 y 128 X 10⁶ UFC/ml o el de Edwards, et al (2005, p. 248) en el cual reportan 1.2 X 10⁶ UFC/ml en efluentes de curtido.

3.3 Evaluación de la resistencia al cromo hexavalente


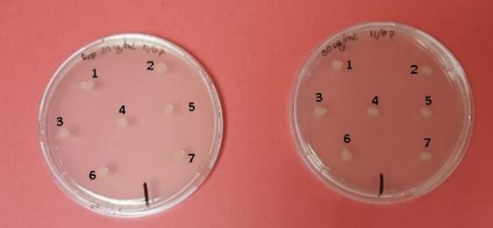
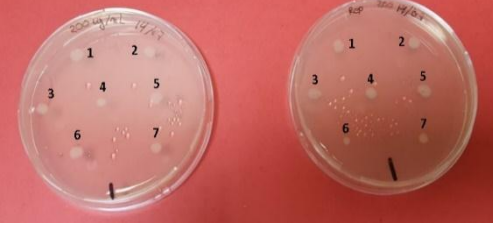
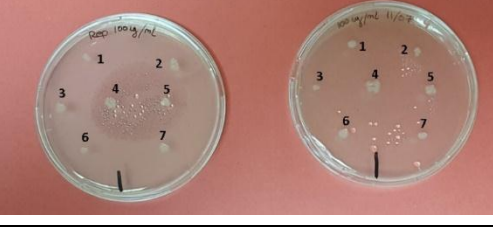

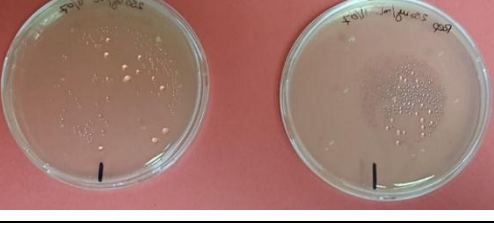
La resistencia de *Ralstonia pickettii* al cromo hexavalente se determinó por el crecimiento uniforme de las colonias en cada uno de los puntos de repique, se evidenció crecimiento en las concentraciones de 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L. Las características de las colonias como el tamaño, el color, el espesor y la textura fueron las mismas en todas las concentraciones (Ver Tabla 1-3)

Pasadas las 72 h no se observó crecimiento de colonias en las placas con concentración de 250 mg/L, por lo tanto se determinó una resistencia máxima de *Ralstonia pickettii* a la concentración de 200 mg/L lo cual es favorable para la investigación tomando en cuenta que la concentración de cromo hexavalente en agua residual de curtumbre no alcanza niveles tan altos.

El umbral de resistencia de 200 mg/L de *R. pickettii* es un valor bajo si lo comparamos con los umbrales de resistencia de otros microorganismos como el hongo *Paecilomyces sp*, que resiste a concentraciones de hasta 500 mg/L de cromo hexavalente según Cárdenas y Acosta (2011, p. 11). Gómez-Bertel, et al (2008, p. 97) en su estudio denominado “Evaluación de tres hongos lignolíticos y de *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles” reporta crecimiento en las siguientes concentraciones de dicromato de potasio *T. versicolor* en 300 mg/L, *A. niger* en 1000 mg/L, *P. ostreatus* en 4500 mg/L y *P. chrysosporium*.

Sin embargo, el valor de resistencia de 200 mg/L no se puede tomar como una certeza, pues según Khade y Adholeya, 2007 citados en (Beltrán & Gómez, 2016, p. 179) se ha reportado que los diferentes aislamientos de una misma especie pueden diferir en la sensibilidad a metales pesados, tomando en cuenta que *R. pickettii* es una bacteria ubicua en el ambiente (M.P. Ryan, et al., 2007, p. 754), es posible pensar que dependiendo del medio del cual se aísle se podría obtener variaciones en su capacidad de resistencia.

Tabla 3-3: Resistencia de *R. pickettii* al cromo hexavalente.

Concentración de cromo hexavalente mg/L	Evidencia fotográfica del crecimiento
Blanco (0 mg/L)	
50 mg/L	
100 mg/L	
150 mg/L	
200 mg/L	
250 mg/L	

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

3.4 Pruebas de degradación de cromo hexavalente en agua sintetizada en laboratorio

Pasadas las 48 horas de incubación, en las unidades de análisis se observó crecimiento bacteriano (Ver Figura 1-3), posteriormente en la medición de la concentración de cromo hexavalente mediante 1,5-Difenil-carbohidraazida, se observó diferencia en la coloración entre la muestra de la unidad de análisis y el blanco (Ver Figura 2-3).



Figura 1-3: Crecimiento bacteriano en la unidad de análisis.

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

A: Unidad de análisis inoculada, B: Blanco sin inocular

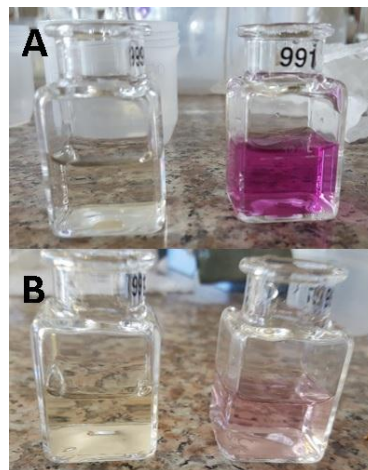


Figura 2-3: 1,5-Difenil-carbohidraazida en agua sintética

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

A: Blanco sin inocular, B: Unidad de análisis inoculada

Tabla 4-3: Resultados de la degradación en agua sintética.

Unidad de análisis	Repetición	Concentración inicial de cromo hexavalente (mg/L)		
		5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L
		Concentración final de cromo hexavalente (mg/L)		
Unidad de análisis 1 (10 ⁸ UFC)	1	0.21	0.76	1.26
	2	0.15	0.59	1.31
	3	0.22	0.70	1.94
Unidad de análisis 2 (2 x 10 ⁸ UFC)	1	0.29	0.77	1.13
	2	0.18	0.85	1.01
	3	0.34	0.69	1.08
Unidad de análisis 3 (3 x 10 ⁸ UFC)	1	0.21	0.89	1.41
	2	0.23	0.89	1.53
	3	0.30	0.78	1.64
Blanco (sin biomasa)		2.23	7.68	12.84

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

3.4.1 Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad de los datos y se realizó un análisis ANOVA de un factor para determinar si la diferencia de las medias de cada unidad de análisis es significativa.

- Concentración inicial 5 mg/L

Tabla 5-3: Análisis ANOVA para la concentración inicial 5 mg/L.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.009	2	.005	1.341	.330
Dentro de grupos	.021	6	.003		
Total	.030	8			

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

Hipótesis

H₀: No existen diferencias significativas en la concentración final de Cr VI al variar la cantidad de biomasa inoculada, $p \geq 0.05$.

H₁: Existen diferencias significativas en la concentración final de Cr VI al variar la cantidad de biomasa inoculada, $p < 0.05$.

Como la significancia es mayor a 0.05, se acepta estadísticamente la hipótesis nula, la cual dice que no existen diferencias significativas en la concentración final de Cr VI al variar la cantidad de biomasa inoculada.

El valor promedio de la concentración final luego del tratamiento con *R. pickettii* fue de 0.24 mg/L, equivalente a un 92.5 % de degradación sin mostrar diferencias significativas entre los valores de cada unidad de análisis (Ver Tabla 4-3).

- Concentración inicial 10 mg/L

Tabla 6-3: Análisis ANOVA para la concentración inicial 10 mg/L.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.043	2	.022	3.640	.092
Dentro de grupos	.036	6	.006		
Total	.079	8			

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

Hipótesis

H₀: No existen diferencias significativas en la concentración final de Cr VI al variar la cantidad de biomasa inoculada, $p \geq 0.05$.

H₁: Existen diferencias significativas en la concentración final de Cr VI al variar la cantidad de biomasa inoculada, $p < 0.05$.

Como la significancia es mayor a 0.05, se acepta estadísticamente la hipótesis nula, la cual dice que no existen diferencias significativas en la concentración final de Cr VI al variar la cantidad de biomasa inoculada.

El valor promedió de la concentración final luego del tratamiento con *R. pickettii* fue de 0.77 mg/L, equivalente a 92.3 % de degradación sin mostrar diferencias significativas entre los valores de cada unidad de análisis (Ver Tabla 4-3).

- **Concentración inicial 15 mg/L**

Tabla 7-3: Análisis ANOVA para la concentración inicial 15 mg/L.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.391	2	.195	3.654	.092
Dentro de grupos	.321	6	.053		
Total	.712	8			

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

Hipótesis

H₀: No existen diferencias significativas en la concentración final de Cr VI al variar la cantidad de biomasa inoculada, $p \geq 0.05$.

H₁: Existen diferencias significativas en la concentración final de Cr VI al variar la cantidad de biomasa inoculada, $p < 0.05$.

Como la significancia es mayor a 0.05, se acepta estadísticamente la hipótesis nula, la cual dice que no existen diferencias significativas en la concentración final de Cr VI al variar la cantidad de biomasa inoculada.

El valor promedió de la concentración final luego del tratamiento con *R. pickettii* fue de 1.37 mg/L, equivalente a 90.87 % de degradación sin mostrar diferencias significativas entre los valores de cada unidad de análisis (Ver Tabla 4-3).

En menor proporción se observó degradación de Cr VI en los blancos de cada unidad de análisis, esto posiblemente se deba al alto contenido de peptona en el caldo nutritivo utilizado como medio de cultivo, las peptonas pueden estar compuestas de péptidos, aminoácidos libres, ácido fólico, biotina o vitaminas como la B1, B2, B6 y B12 (Sagardoy & Mandolesi, 2004, p. 39), pues como

textualmente cita Ramírez, et al (2008, p. 325) “la remoción de Cr VI puede ser llevada a cabo por compuestos como aminoácidos, nucleótidos, azúcares, vitaminas y ácidos orgánicos”.

La reducción de Cr VI en los blancos también es reportada por Guevara Zumárraga (2010, p. 37) en su investigación, además sugiere que se debe a la presencia de algún agente degradante en el medio de cultivo utilizado.

En cuanto a los porcentajes de degradación de Cr VI, Sharoori, et al (2000, p. 350) reporta un porcentaje de degradación de 87.17 % en caldo LB suplementado con 21.5 mg/ml de dicromato de potasio, por otro lado Guevara Zumárraga (2010, p. 63) en su investigación reporta que las cepas no especificadas, con codificación I5 y M3 redujeron la concentración de Cr VI en 98 % a partir de una concentración inicial de 10 mg/L.

En el tratamiento con *R. pickettii* los valores de 92, 5; 92,3 y 90.87 % de degradación para las concentraciones de 5, 10 y 15 mg/L de Cr VI, nos muestran un comportamiento inversamente proporcional en donde a medida que la concentración inicial aumenta, el porcentaje de degradación disminuye, por lo que solo para la concentración inicial de 5 mg/L se alcanzan concentraciones finales bajo el límite permitido por la legislación ecuatoriana de 0.5 mg/L para Cr VI (Ver Gráfico 1-3). Esto nos indica que posiblemente el mecanismo usado por *R. pickettii* para la descontaminación de Cr VI sea la bioacumulación, pues al aumentar la concentración del contaminante la célula se satura con mayor facilidad, además al no existir cambio en la coloración del medio podemos concluir que no existe reducción a Cr III.

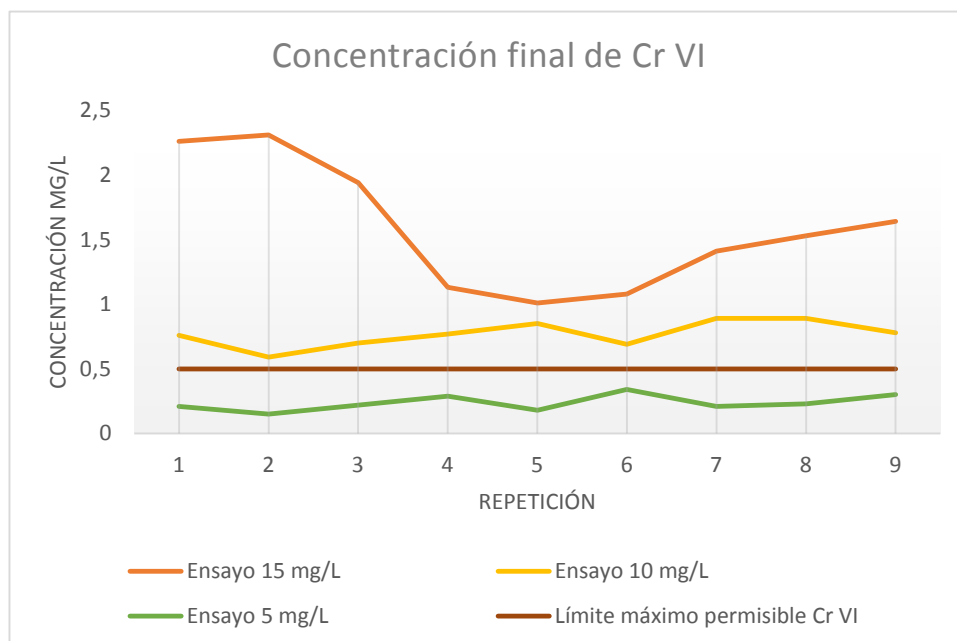


Gráfico 1-3: Concentraciones finales de Cr VI en los ensayos 5mg/L, 10mg/L y 15 mg/L.

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

3.5 Degradación de cromo hexavalente en agua residual de curtiembre

Para las curtimbres A y B, en las cuales no hubo crecimiento bacteriano en la caracterización del agua residual, se elaboró una prueba de crecimiento inoculando en 100 ml de agua residual, 1,2 y 3 ml de un cultivo overnight (aproximadamente 1×10^8 UFC/ml), se incubó durante 48 horas a 35°C, posteriormente se realizó una siembra en superficie en agar nutritivo y agar PCA, sin embargo no se evidenció crecimiento, debido a la presencia de agentes químicos usados durante el proceso de curtido.

Los ensayos de degradación en agua residual se los realizó en el agua residual de la curtiembre C, esto debido a que se obtuvo un promedio de 3850 UFC/ml en el conteo de heterótrofos demostrando la posibilidad de crecimiento microbiano, sin embargo los resultados de los análisis de concentración de cromo hexavalente en la curtiembre C se encuentran bajo el límite máximo permisible establecido en la normativa ecuatoriana, por tanto fue necesario usar peróxido de hidrogeno en dilución como oxidante para alcanzar una concentración superior a 0.5 mg/L de Cr VI en el agua residual.

En un volumen de 3000 ml de agua residual, al añadir 5 ml de la solución de peróxido de hidrogeno se alcanzó una concentración de 0.44 mg/L de Cr VI, al añadir otros 5 ml de la solución de peróxido de hidrogeno se alcanzó una concentración de 0.61 mg/L, una vez que la concentración de Cr VI se estabilizó, se procedió con el tratamiento.

Después del tratamiento con *R. pickettii*, en la medición de la concentración de cromo hexavalente con 1,5-Difenil-carbohidraazida, se observó diferencia en la coloración entre la muestra de la unidad de análisis y el blanco sin inocular (Ver Figura 4-3).

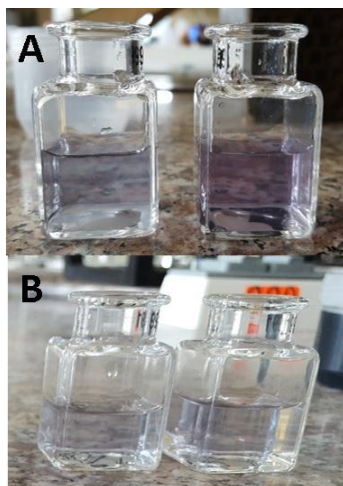


Figura 3-3: 1,5-Difenil-carbohidraazida en agua residual.

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

A: Blanco sin inocular, B: Unidad de análisis inoculada

En el sedimento de las muestras centrifugadas no se encontró aparente diferencia (Ver Figura 4-3), por tanto se podría señalar que el crecimiento bacteriano en las tres unidades de análisis es prácticamente el mismo, posiblemente porque se usó la misma cantidad de nutriente en las tres unidades de análisis.



Figura 4-3: Sedimento en las muestras centrifugadas

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

A: Unidad de análisis 1, B: Unidad de análisis 2, C: Unidad de análisis 3

Tabla 8-3: Resultados de la degradación en agua residual.

Unidad de análisis	Repetición	Tiempo de incubación		
		24h	48h	72h
		Concentración final de cromo hexavalente (mg/L)		
Unidad de análisis 1	1	0.27	0.29	0.24
	2	0.25	0.24	0.26
	3	0.29	0.26	0.27
Unidad de análisis 2	1	0.28	0.25	0.29
	2	0.29	0.28	0.29
	3	0.26	0.23	0.26
Unidad de análisis 3	1	0.29	0.26	0.25
	2	0.25	0.28	0.23
	3	0.24	0.25	0.27
Blanco sin inóculo		0.43	0.47	0.46

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

3.5.1 Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad de los datos y se utilizó un modelo lineal general para determinar el efecto de dos factores sobre una variable dependiente por separado y el efecto de la interacción de ambos.

Tabla 7-3: Análisis estadístico de la degradación de Cr VI en agua residual.

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: Concentración_final					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.002 ^a	8	.000	.746	.652
Intersección	1.878	1	1.878	4486.230	.000
Unidad_Análisis	.001	2	.000	.805	.462
Tiempo_incubación	.000	2	.000	.460	.638
Unidad_Análisis * Tiempo_incubación	.001	4	.000	.858	.507
Error	.008	18	.000		
Total	1.888	27			
Total corregido	.010	26			

Realizado por: Kevin Veloz, 2018

Hipótesis

H₀: El efecto de los factores (cantidad de biomasa y tiempo de incubación) sobre la variable dependiente (Concentración final de Cr VI) no es significativo, $p \geq 0.05$.

H₁: El efecto de los factores (cantidad de biomasa y tiempo de incubación) sobre la variable dependiente (Concentración final de Cr VI) es significativo, $p < 0.05$.

Como la significancia es mayor a 0.05 se acepta la hipótesis nula que dice que El efecto de los factores (cantidad de biomasa y tiempo de incubación) sobre la variable dependiente (Concentración final de Cr VI) no es significativo, por tanto podemos mencionar que con una cantidad de biomasa inoculada de 5×10^8 UFC/ ml y un tiempo de incubación se 24 h se alcanzó el nivel máximo de degradación de *R. pickettii*, no observándose mejoras en los ensayos de 48 y 72 horas.

El valor promedio de degradación fue de 58.2 %, el cual se puede considerar bajo en comparación del porcentaje reportado por Zahoor y Rehman (2009, p. 817) de 86 % para *Bacillus sp* y 89 %

para *S. capitis*, sin embargo es mayor al reportado por Otiniano, et al (2007, p. 38) de 13.1 % de degradación en efluentes de curtido utilizando *Pseudomonas sp.*

Pasadas las 72 horas de incubación el porcentaje promedio de degradación fue de 58.73 %, dando una concentración promedio final de 0.26 mg/L de cromo hexavalente, valor que no difiere significativamente con los obtenidos a las 24 y 48 horas y que se encuentra por debajo del límite máximo permisible de 0.5 mg/L para descargas al alcantarillado público y cuerpos de agua superficiales establecido en la normativa ecuatoriana (TULSMA, 2015, pp. 316-333), por lo tanto no es la mejor alternativa pero cumple con su objetivo.

CONCLUSIONES

- La caracterización del agua residual en las curtiembres A, B y C mostró valores para temperatura entre 15.2 y 16.1 °C, pH entre 3.49 y 4.41 y Cr VI entre 0.09 y 0.22 mg/L. Los valores de conductividad eléctrica en las curtiembres A y B oscilaron 16.2 y 23.7 mS/cm, mientras que en la curtiembre C los valores se reportaron entre 8.61 y 11.2 mS/cm; finalmente, en el conteo de heterótrofos en las curtiembres A y B no se obtuvo crecimiento mientras que en la curtiembre C se observó un crecimiento promedio de 3850 UFC/ml.
- Se evaluó la resistencia de *R. pickettii* al cromo hexavalente usando como sal de cromo el dicromato de potasio, donde la resistencia máxima se estableció en 200 mg/L, observándose crecimiento nulo en las cajas con concentración de 250 mg/L.
- El porcentaje promedio de degradación de cromo hexavalente fue de 95.2 % en agua sintética con una concentración inicial de 5 mg/L, 92.3 % para la concentración inicial de 10 mg/L y 90.87 % para la concentración inicial de 15 mg/L, notándose pérdida paulatina en la capacidad de degradación a medida que aumenta la concentración inicial.
- El porcentaje promedio de degradación de cromo hexavalente en agua residual de curtiembre fue de 57.14 % a las 24 horas, y de 58.73 % a las 48 y 72 horas de tratamiento, mostrando que no existe una mejora significativa en la degradación de cromo hexavalente con respecto al tiempo, además se determinó que las variaciones de biomasa no alteran el proceso de degradación, pues se obtuvieron resultados similares cuando se inoculó 5×10^8 UFC/ml y 15×10^8 UFC/ml.
- *R. pickettii* fue capaz de reducir la concentración de Cr VI en agua residual de curtiembre en 57.14 %, lo cual permitió cumplir con la normativa ecuatoriana para descargas al alcantarillado público y cuerpos de agua superficiales, sin embargo se han reportado microorganismos como *Bacillus sp* capaz de reducir la concentración de Cr VI en 86 % o *S. capitatus* en 89 %, los cuales son más eficientes para su aplicación en tratamientos a escala real.

RECOMENDACIONES

- Analizar la resistencia al cromo hexavalente en cepas aisladas de medios contaminados con diferentes tipos de metales para poder evaluar las diferencias en las concentraciones mínimas inhibitorias.
- Determinar los mecanismos utilizados por *R. pickettii* para la descontaminación de aguas residuales de curtiembre.
- Determinar la capacidad *R.pickettii* para la remoción de cromo trivalente presente también en aguas residuales provenientes de curtiembre.
- Diseñar un plan piloto para el tratamiento de grandes volúmenes de agua residual de curtiembre con *R. pickettii*.

BIBLIOGRAFÍA

AGUDELO, S. & GUTIÉRREZ, P. "Ahorro de agua y materia prima en los procesos de pelambre y curtido mediante precipitación y recirculación de aguas". *DYNA Revista de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín)* [En línea]. 2007, (Colombia) Vol. 74(152). pp. 241-250. ISSN 0012-7353. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v74n152/a22v74n152.pdf>

AHEMAD, M. & MALIK, A. "Bioaccumulation of Heavy Metals by Zn Resistant Bacteria Isolated from Agricultural Soils Irrigated with Wastewater". *Bacteriology Journal* [En línea]. 2012, (Estados Unidos) Vol 2(1). pp. 12-21. ISSN 2153-0211. Disponible en: <http://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/bj/2012/12-21.pdf>

ALVAREZ, et al. "Caracterización de Agua Residual de Curtiduría y Estudio del Lirio Acuático en la Recuperación de Cromo". *Revista Información Tecnológica* [En línea]. 2004, (Chile) Vol 15(3). pp. 75-80. ISSN 0718-0764. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-07642004000300012&script=sci_arttext

AQUIAHUATL, M. & PÉREZ, M. *Manual de prácticas del laboratorio de microbiología genera* .[En línea] Iztapalapa-México: Casa abierta al tiempo, 2004. Disponible en: http://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/diversos/AQUIAHUATL_RAMOS_MARIA_DE_LOS_ANGELES_Manual_de_practicas_de.pdf

BELTRÁN PINEDA, M. E. & GÓMEZ RODRÍGUEZ, A. M. "Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg). Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una revisión". *Revista Facultad de Ciencias Básicas* [En línea]. 2016 (Colombia) Vol 12(2). pp. 172-197. ISSN 1900-4699. Disponible en: <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/viewFile/2027/1835>

BENITEZ CAMPO, N. "Producción limpia y bioremediación para disminución de la contaminación por cromo en la industria de curtiembres". *Revista Ambiente y Sostenibilidad del Doctorado Interinstitucional en Ciencias Ambientales* [En línea]. 2011 (Colombia) Vol 1. pp. 25-31. ISSN: 2339-3122. Disponible en: <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co:8080/bitstream/10893/8248/1/produccion%20limpia.pdf>

BRUINS, et al. "Microbial Resistance to Metals in the Environment". *Ecotoxicology and Environmental Safety - Journal* [En línea]. 2000 (Estados Unidos) Vol 45. pp. 198-207. ISSN: 0147-6513. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651399918602>

CÁRDENAS GONZÁLEZ, J. F. & ACOSTA RODRÍGUEZ, I. "Remoción de Cromo Hexavalente por el Hongo Paecilomyces sp. Aislado del Medio Ambiente". *Revista Información tecnológica* [En línea]. 2011 (Chile) Vol 22(1). pp. 9-16. ISSN: 0718-0764. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v22n1/art03.pdf>

CASTILLO, et al. *Biotecnología Ambiental* [En línea]. Madrid-España. Tébar, 2005. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=19ffPAm3E3kC&printsec=frontcover&dq=Biotecnolog%C3%ADa+Ambiental&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwja5fmEnPXaAhUJT98KHRy1B_QQ6AEIJjAA#v=onepage&q=Biotecnolog%C3%ADa%20Ambiental&f=false

CERVANTES, et al. "Interacciones microbianas con metales pesados". *Revista Latinoamericana de Microbiología* [En línea]. 2006 (México) Vol 48(2). pp. 203-210. ISSN: 0034-9771. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Francisco_Javier_Acevedo-Aguilar/publication/6259274_Microbial_interactions_with_heavy_metals/links/543d5f200cf240f04d104285.pdf

CHÁVEZ PORRAS ÁLVARO. "Descripción de la nocividad del cromo proveniente de la industria curtiembre y de las posibles formas de removerlo". *Revista Ingenierías* [En línea]. 2010 (Colombia) Vol 9(17). pp. 41-49. ISSN: 2248-4094. Disponible en: <http://revistas.udem.edu.co/index.php/ingenierias/article/view/6/4>

DUARTE, et al. "Remoción de Cromo de aguas residuales de curtiembres usando Quitosan obtenido de desechos de camarón". *Revista Scientia et Checnica* [En línea]. 2009 (Colombia) Vol 2(42). pp 290-295. ISSN: 0122-1701. Disponible en: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/2679/1401>

EDWARDS, et al. "Biodegradation of naphthalene-2-sulfonic acid present in tannery wastewater by bacterial isolates Arthrobacter sp. 2AC and Comamonas sp. 4BC". *Journal Biodegradation* [En línea]. 2005 (Estados Unidos) Vol (16(3), pp. 237-252. ISSN: 1572-9729. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10532-004-0889-8>

EL - TAWHEEL, et al. "Removal of Cr(VI) ions from waste water by electrocoagulation using iron electrode". *Egyptian Journal of Petroleum* [En línea]. 2015 (Egipto) Vol 24. pp 183-192. ISSN: 1110-0621. Disponible en: https://ac.els-cdn.com/S1110062115000355/1-s2.0-S1110062115000355-main.pdf?_tid=6fd2c1c4-1eff-4c5b-97fc-69e8b422a78c&acdnat=1523332602_2645b2caf52aa66cf1a0d68563198cf6

ESPARZA, E. & GAMBOA, N. "Contaminación debida a la industria curtiembre". *Revista de Química* [En línea]. 2001 (Perú) Vol 15. pp 41-63. ISSN: 2518-2803. Disponible en: <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/4756/4757>

GALVÃO & COREY. *Manual de vigilancia ambiental y epidemiológica Serie 5, Cromo* [En línea]. Metepec-México, 1987. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsea/e/fulltext/cromo/cromo.pdf>

GÓMEZ, et al. "Evaluación de tres hongos lignolíticos y de *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* [En línea]. 2008 (México) Vol 24(3), pp. 93-106. ISSN: 0188-4999. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v24n3/v24n3a1.pdf>

GONZÁLEZ CHÁVEZ MARÍA DEL CARMEN. "Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos". *Revista Terra Latinoamericana* [En línea]. 2005 (México) Vol 23(1), pp. 29-37. ISSN: 2395-8030. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/573/57323104.pdf>

GUEVARA ZUMÁRRAGA DIANA SOFÍA. Biorremoción de cromo (cromo total y cromo VI) en agua sintética por dos inóculos bacterianos nativos compuestos, a escala de laboratorio (Tesis). Escuela Superior Politécnica del Ejercito, Departamento de Ciencias de la Vida. Quito-Ecuador. 2010. pp 37-63.

HERNÁNDEZ, et al. "Reducción de cromo hexavalente y degradación de rojo de metilo por bacterias aisladas de sedimentos del Lago de Chapala, México". *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* [En línea]. 2016 (México) Vol 12(2). pp 66-73. ISSN: 2310-2799. Disponible en: <https://www.itson.mx/publicaciones/rlrn/Documents/v12-n2-3-reducci%C3%B3n-de-cromo-hexavalente-y-degradaci%C3%B3n-de-rojo-de-metilo-por-bacterias-aisladas-de-sedimentos-del-Lago-de.pdf>

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, *Fundamentos y técnicas para la preservación de bacterias, hongos y levaduras* [En línea]. Bogotá-Colombia, 2016. Disponible en: <http://www.ibun.unal.edu.co/lineasGrupos/GruposTransversales/doc/lineamientos.pdf>

KAHNG, et al. "Characterization and Role of *tbuX* in Utilization of Toluene by *Ralstonia pickettii* PKO1". *Journal of Bacteriology* [En línea]. 2000 (Estados Unidos) Vol 182(5). pp. 1232-1242. ISSN: 1098-5530. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC94407/pdf/jb001232.pdf>

M.P. RYAN, et al. "*Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications". *Journal of Applied Microbiology* [En línea]. 2007 (Reino Unido) Vol 103(4). pp 754-764. ISSN: 1364-5072. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2672.2007.03361.x>

MARRERO, et al. "Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación". *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* [En línea]. 2010 (Cuba) Vol 41(1), pp. 67-78. ISSN: 0253-5688. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181221644010.pdf>

MÉNDEZ, et al. *Producción limpia en la industria de curtiembre* [En línea]. España, 2007. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Gladys_Vidal/publication/322851783_Produccion_limpia_en_la_Industria_de_curtiembre/links/5a728c03458515512075f2a9/Produccion-limpia-en-la-Industria-de-curtiembre.pdf

MIJNENDONCKX, et al. "Characterization of the Survival Ability of *Cupriavidus metallidurans* and *Ralstonia pickettii* from Space-Related Environments". *Microbial Ecology* [En línea]. 2013. 65(2), pp. 347-360. ISSN: 0095-3628. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-012-0139-2>

MORAGA, et al. "Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique". *Revista Investigaciones Marinas* [En línea]. 2003 (Chile). Vol 31(1), pp. 91-95. ISSN: 0717-7178. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/imar/v31n1/art10.pdf>

MUNZ, et al. "Characterization of tannery wastewater and biomass in a membrane bioreactor using respirometric analysis". *Journal Bioresource Technology* [En línea]. 2008, Vol 99(18), pp. 8612-8618. ISSN: 0960-8524. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408003143>

NTE INEN 2169:2013. Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras.

NTE INEN 2176:1998. Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo.

OTINIANO, et al. "Biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas* sp y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*". *Revista Médica Vallejiana* [En línea]. 2007 (Perú) Vol 4(1). pp. 32-42. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rmv/v04n1/pdf/a04v4n1.pdf>

PASTERÁN, F. & GALAS, M. *Manual de procedimientos, sensibilidad a los antimicrobianos en Salmonella, Shigella y E.coli* [En línea]. Argentina, 2008. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/99762781/Manual-de-Procedimiento-Atb-Who>

PRADHAN, et al. "Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [En línea]. 2017 Vol 55(1). pp. 1-20. ISSN: 1226-086x. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X17303295>

RAJENDRAN, et al. "Microbes in heavy metal remediation". *Indian Journal of Experimental Biology* [En línea]. 2003 (India) Vol 41(1), pp. 935-944. ISSN: 0975-1009. Disponible en: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/17153/1/IJEB%2041%289%29%20935-944.pdf>

RAMÍREZ CANDO LENIN. Aislamiento, caracterización y conservación de bacterias no entéricas con capacidad de adaptación en altas concentraciones de plata, presentes en una laguna de sedimentación de la planta minero del sector El Pache - Portovelo - El Oro (Tesis). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Quito-Ecuador. 2012. p. 44.

RAMÍREZ, et al. "Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds". *BioMetals (Journal)* [En línea]. 2008 Vol 21(3), pp. 321-332. ISSN: 1572-8773. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10534-007-9121-8>

RAMÍREZ, et al. "Reducción bacteriana de cromo hexavalente: mecanismos y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica* [En línea]. 2009 (México) Vol 28(3) pp. 73 - 79. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2009/reb093b.pdf>

REGUEIRA HORNINK KARINA. Aislamiento e identificación de bacterias con potencial para realizar biorremediación de cobre (Tesis). Instituto Butantan. Sao Paulo-Brasil. 2015. p.23.

RENGIFO, et al. "Efecto de la asociación alga - bacteria *Bostrychia calliptera* (Rhodomelaceae) en el porcentaje de remoción de cromo en laboratorio". *Revista Biología Tropical* [En línea]. 2012 (Colombia) Vol 60(3). pp. 1055-1064. ISSN: 0034-7744. Disponible en: <http://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v60n3/a08v60n3>

SAGARDOY, MARCELO A. & MANDOLESI, MARÍA. E. *Biología del Suelo* [En línea]. Bahía Blanca-Argentina: EdiUNS. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=-Uvg75tgmWoC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbp_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

SALINAS VÁSQUEZ VERÓNICA. El cuero, producción industrial y artesanal en el Ecuador (Tesis). Universidad del Azuay, Cuenca-Ecuador, 2014. pp. 21-33.

SALVADOR CLAUDIO. *Historia de la industria curtidora argentina* [En línea]. Buenos Aires-Argentina: DUNKEN, 2013. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=ofTrAQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

SARKAR BIBUDHENDRA. *Heavy metals in the environment* [En línea]. New York-Estados Unidos: Marcel Dekker INC, 2002. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=OJboWGzbq1EC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Heavy+metals+in+the+environment&ots=IRt0QM23q5&sig=6KcOZcXnuViK1fmXzfNvXEUzenY#v=onepage&q=Heavy%20metals%20in%20the%20environment&f=false>

SHAKOORI, et al. "Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries". *Applied Microbiology and Biotechnology (Journal)* [En línea]. 2000 Vol 53(3), pp. 348-351. ISSN: 1432-0614. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530050033>

SRINATH, et al. "Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria". *Chemosphere (Journal)* [En línea]. 2002 Vol 48(4). pp. 427-435. ISSN: 0045-6535. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653502000899>

TAPIA, et al. "Estudio de reducción fotocatalítica de cromo hexavalente". *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* [En línea]. 2002 (Chile) Vol 47(4). pp. 469-476. ISSN: 0366-1644. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0366-16442002000400018&script=sci_arttext&tlng=pt

TÉLLEZ, et al. "Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización de Cromo en el proceso productivo de curtiembres". *Revista de la Facultad de Medicina* [En línea]. 2004 (Colombia) Vol 52(1). pp. 50-61. ISSN: 2357-3848. Disponible en: <https://search.proquest.com/openview/c8f6c1dc58b086be05612e8958ff592a/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2035757>

TORRES RODRÍGUEZ DUILIO. "El papel de los microorganismos en la degradación de compuestos tóxicos". *Revista Ecosistemas* [En línea]. 2003 (España) Vol 12(2). pp. 1-5. ISSN: 1132-6344. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/540/54012219.pdf>

TULSMA. Texto Unificado de legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente.

WANG, Y.T. & SHEN, H. Bacterial reduction of hexavalent chromium. *Journal of Industrial Microbiology* [En línea]. 1995 Vol 14(2). pp. 159-163. ISSN: 1476-5535. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01569898#citeas>

WEBER WALTER J. *Control de la calidad del agua. Procesos fisicoquímicos* [En línea]. New York-Estados Unidos: REVERTÉ, S.A. 2003. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=TLpzh5HQYvgC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Control+de+la+calidad+del+agua.+Procesos+fisicoqu%C3%ADmicos&ots=hQaX-GCcUw&sig=7p4176sjeVjno_0Rq1zXmClq_iM#v=onepage&q&f=false

XIE et al. "Heavy metal resistance by two bacteria strains isolated from a copper mine tailing in China". *African Journal of Biotechnology* [En línea]. 2010 (China) Vol 9(26), pp. 4036-4066. ISSN: 1684-5315. Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/82567>

ZAHOOR, A. & REHMAN, A. "Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater". *Journal of Environmental Sciences* [En línea]. 2009 Vol 21(6), pp. 814-820. ISSN: 1001-0742. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074208623463>

ZÁRATE, et al. Guía técnica para la minimización de residuos en curtiembres. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. Lima-Perú, 1993. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan/005343/005343.htm>

Anexo A: Hoja técnica agar nutritivo

Nutrient Agar

Intended Use

Nutrient Agar is used for the cultivation of bacteria and for the enumeration of organisms in water, sewage, feces and other materials.

Summary and Explanation

Early in the 20th century, the American Public Health Association published the formula for a general purpose medium for the growth of a wide variety of nonfastidious microorganisms.¹ This was in recognition of the need for a standardized medium for the use in the examination of water and wastewater, dairy products and various foods. This relatively simple formulation has stood the test of time, and with the name of Nutrient Agar, is still specified in current compendia of methods for the microbiological examination of a broad spectrum of materials.²⁻⁵ Additionally, it is used in the laboratory for the cultivation and maintenance of nonfastidious species.

Principles of the Procedure

Nutrient Agar consists of peptone, beef extract and agar. This relatively simple formulation provides the nutrients necessary for the replication of a large number of microorganisms that are not excessively fastidious. The beef extract contains water-soluble substances including carbohydrates, vitamins, organic nitrogen compounds and salts. Peptones are the principle sources of organic nitrogen, particularly amino acids and long-chained peptides. Agar is the solidifying agent.

Formula

Difco™ Nutrient Agar

Approximate Formula* Per Liter	
Beef Extract.....	3.0 g
Peptone.....	5.0 g
Agar.....	15.0 g

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Directions for Preparation from Dehydrated Product

- Suspend 23 g of the powder in 1 L of purified water. Mix thoroughly.
- Heat with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.
- Autoclave at 121°C for 15 minutes.
- Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

Procedure

Liquefy the agar if prepared tubes are used, cool to 45-50°C and pour into Petri dishes. Allow to solidify for at least 30 minutes. Use standard procedures to obtain isolated colonies from specimens. Incubate plates at 35 ± 2°C for 18-24 hours and 42-48 hours, if necessary.

User Quality Control

Identity Specifications

Difco™ Nutrient Agar

Dehydrated Appearance:	Tan, free-flowing, homogeneous.
Solution:	2.3% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is light to medium amber, clear to slightly opalescent.
Prepared Appearance:	Light amber, very slightly to slightly opalescent.
Reaction of 2.3% Solution at 25°C:	pH 6.8 ± 0.2

Cultural Response

Difco™ Nutrient Agar

Prepare the medium per label directions. Inoculate and incubate at 35 ± 2°C for 18-48 hours.

ORGANISM	ATCC™	INOCULUM CFU	RECOVERY
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433	10 ² -10 ³	Good
<i>Escherichia coli</i>	25922	10 ² -10 ³	Good
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	10 ² -10 ³	Good

Tubed slants are used primarily for the cultivation and maintenance of pure cultures. They should be inoculated with an inoculating loop and incubated under the same conditions as the plated medium.

Expected Results

Examine plates for growth.

Growth from tubes inoculated with pure cultures may be used for biochemical and/or serological testing.

References

- American Public Health Association. 1917. Standard methods of water analysis, 3rd ed. American Public Health Association, New York, N.Y.
- U.S. Food and Drug Administration. 2001. Bacteriological analytical manual, online. AOAC International, Gaithersburg, Md.
- Eaton, Rice and Baird (ed.). 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed., online. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Horwitz (ed.). 2007. Official methods of analysis of AOAC International, 18th ed., online. AOAC International, Gaithersburg, Md.
- Downes and Ho (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Availability

Difco™ Nutrient Agar

	AOAC	BAM	CCAM	COMP	ISO	SMWW	USDA
Cat. No. 212000							
213000							
211665							

BBL™ Nutrient Agar

	AOAC	BAM	CCAM	COMP	ISO	SMWW	USDA
United States and Canada							
Cat. No. 297801							
220968							
220971							

Mexico							
Cat. No. 257500							

*Store at 2-8°C.



Anexo B: Hoja técnica caldo nutritivo

Nutrient Broth

Intended Use

Nutrient Broth is used for the cultivation of many species of nonfastidious microorganisms.

Summary and Explanation

Nutrient Broth has the formula originally designed for use in the *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. It is not a recommended bacteriological medium in later editions of this publication. It is one of several nonselective media useful in routine cultivation of microorganisms.¹⁻³

Principles of the Procedure

This relatively simple formulation supports the growth of nonfastidious microorganisms due to its content of peptone and beef extract.

User Quality Control

Identity Specifications

Difco™ Nutrient Broth

Dehydrated Appearance: Medium tan, free-flowing, homogeneous.

Solution: 0.8% solution, soluble in purified water. Solution is light to medium amber, clear.

Prepared Appearance: Light to medium amber, clear.

Reaction of 0.8%

Solution at 25°C: pH 6.8 ± 0.2

Cultural Response

Difco™ Nutrient Broth

Prepare the medium per label directions. Inoculate and incubate at 35 ± 2°C for 18-24 hours.

ORGANISM	ATCC*	INOCULUM CFU	RECOVERY
<i>Escherichia coli</i>	25922	10 ⁶ -10 ⁸	Good
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	10 ⁶ -10 ⁸	Good

Formula

Difco™ Nutrient Broth

Approximate Formula* Per Liter

Beef Extract.....	3.0	g
Peptone	5.0	g

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Directions for Preparation from Dehydrated Product

1. Dissolve 8 g of the powder in 1 L of purified water.
2. Autoclave at 121°C for 15 minutes.
3. Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

Procedure

Inoculate tubes of the broth medium with the test samples. Incubate tubes for 18-24 hours at 35 ± 2°C in an aerobic atmosphere.

Expected Results

After incubation, growth is evidenced by the appearance of turbidity in the broth. Aliquots of the broth can be used for subculturing to solid media for purification and identification purposes.

References

1. Marshall (ed.). 1993. *Standard methods for the examination of dairy products*, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
2. U.S. Food and Drug Administration. 2001. *Bacteriological analytical manual*, online. AOAC International, Gaithersburg, Md.
3. Downes and Ito (ed.). 2001. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Availability

Difco™ Nutrient Broth

AOAC BAM CCAM COMPF SMD

Cat. No. 233000 Dehydrated – 100 g
234000 Dehydrated – 500 g

Plate Count Agar/Standard Methods Agar (Tryptone Glucose Yeast Agar)

Intended Use

Plate Count Agar and Standard Methods Agar (Plate Count Agar; Tryptone Glucose Yeast Agar) are used for obtaining microbial plate counts from milk and dairy products, foods, water and other materials of sanitary importance.

Summary and Explanation

Plate Count Agar and Standard Methods Agar are made according to the American Public Health Association (APHA) formulation.¹ They are recommended for obtaining plate counts for milk and other dairy products and may also be used to determine the sanitary quality of foods, water and other materials.¹⁻³

Each lot of dehydrated medium base is subjected to the APHA quality control test and has met the APHA requirements.^{1,4} Appropriate references should be consulted for standard plate count procedures recommended by the APHA and other agencies.¹⁻⁵

The Hyccheck[™] hygiene contact slide is a double-sided paddle containing two agar surfaces for immersing into fluids or sampling surfaces. There are two slides with Plate Count Agar: one contains Plate Count Agar on one side of the slide and the medium with triphenyltetrazolium chloride (TTC) on the other side; the second slide contains Plate Count Agar with TTC on both sides.

Principles of the Procedure

Enzymatic digest of casein provides the amino acids and other complex nitrogenous substances necessary to support bacterial growth. Yeast extract primarily supplies the B-complex vitamins, and dextrose is an energy source. TTC is reduced to the insoluble formazan inside the bacterial cell producing red-colored colonies.

Formula

Difco[™] Plate Count Agar or BBL[™] Standard Methods Agar

Approximate Formula* Per Liter	
Pancreatic Digest of Casein	5.0 g
Yeast Extract	2.5 g
Dextrose	1.0 g
Agar	15.0 g

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Directions for Preparation from Dehydrated Product

1. Suspend 23.5 g of the powder in 1 L of purified water. Mix thoroughly.
2. Heat with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.
3. Autoclave at 121°C for 15 minutes.
4. Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

Procedure

Consult appropriate references for information regarding the processing and inoculation of food, water samples and other materials.^{1,3}

Liquefy the medium in pour tubes and bottles by heating in boiling water. Cool to 45-50°C.

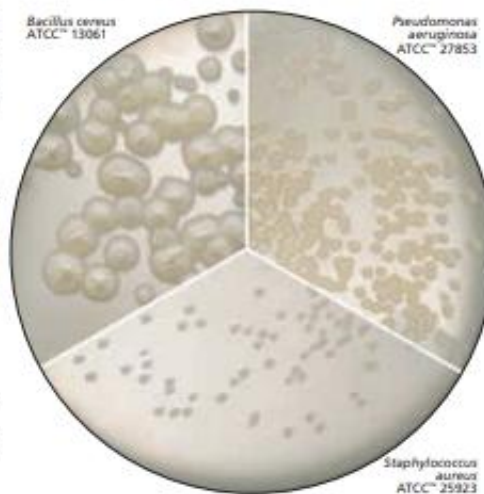
Usually 1 mL samples of appropriate dilutions of the test sample are pipetted into sterile Petri dishes and molten, cooled medium is added followed by gently mixing to distribute the sample dilution throughout the agar. Incubate hardened plates for 48 ± 3 hours at 32 ± 1°C (dairy products) or 35 ± 0.5°C (foods) in an aerobic atmosphere.

Expected Results

Follow recommended procedures for the counting of colonies and the reporting of results.¹⁻⁵

References

1. Wehr and Frank (ed.). 2004. Standard methods for the examination of dairy products, 17th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
2. DeMan and Ho (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
3. Eaton, Rice and Baird (ed.). 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed., online. American Public Health Association, Washington, D.C.
4. Horwitz (ed.). 2007. Official methods of analysis of AOAC International, 18th ed., online. AOAC International, Gaithersburg, MD.
5. US Food and Drug Administration. 2001. Bacteriological analytical manual, online. AOAC International, Gaithersburg, MD.
6. Murph (ed.). 1978. Standard methods for the examination of dairy products, 14th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.



User Quality Control

NOTE: Differences in the Identity Specifications and Cultural Response testing for media offered as both **Difco™** and **BBL™** brands may reflect differences in the development and testing of media for industrial and clinical applications, per the referenced publications.

Identity Specifications

Difco™ Plate Count Agar

Dehydrated Appearance: Light beige, free-flowing, homogeneous.

Solution: 2.35% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is light amber, slightly opalescent.

Prepared Appearance: Light amber, slightly opalescent.

Reaction of 2.35%

Solution at 25°C: pH 7.0 ± 0.2

Cultural Response

Difco™ Plate Count Agar

Prepare the medium per label directions. Inoculate using the pour plate method and incubate at 35 ± 2°C for 18-48 hours.

ORGANISM	ATCC™	INOCULUM CFU	RECOVERY
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	11506	30-300	Good
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	30-300	Good

Identity Specifications

BBL™ Standard Methods Agar

Dehydrated Appearance: Fine to medium fine, may contain small tan and white flecks, homogeneous, free of extraneous material.

Solution: 2.35% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is light to medium, yellow to tan, clear to slightly opalescent.

Prepared Appearance: Light to medium, yellow to tan, clear to slightly opalescent.

Reaction of 2.35%

Solution at 25°C: pH 7.0 ± 0.2

Cultural Response

BBL™ Standard Methods Agar

Prepare the medium per label directions. Inoculate using the pour plate method and incubate *Bacillus stearothermophilus* at 55-60°C and 35 ± 2°C for all other organisms for 18-48 hours.

ORGANISM	ATCC™	INOCULUM CFU	RECOVERY
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	30-300	Good
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	7953	30-300	Good
<i>Enterococcus hirae</i>	10541	30-300	Good
<i>Escherichia coli</i>	25922	30-300	Good
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	7469	30-300	Good
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	12315	30-300	Good

Availability

Difco™ Plate Count Agar

AOAC BAM CCAM COMPF EPA ISO SMD SMWW USDA

Cat. No. 247930 Dehydrated – 100 g
247940 Dehydrated – 500 g
247910 Dehydrated – 2 kg
247920 Dehydrated – 10 kg

Difco™ Hycheck™ Hygiene Contact Slides

Cat. No. 290005 Plate Count Agar // Plate Count Agar with TTC – Pkg. of 10 slides*
290004 Plate Count Agar with TTC // Plate Count Agar with TTC – Pkg. of 10 slides*

BBL™ Standard Methods Agar

AOAC BAM CCAM COMPF EPA ISO SMD SMWW USDA

Cat. No. 212455 Dehydrated – 100 g
211638 Dehydrated – 500 g
211641 Dehydrated – 5 lb (2.3 kg)

United States and Canada

Cat. No. 297030 Prepared Plates – Pkg. of 20*
221030 Prepared Pour Tubes – Pkg. of 10
299094 Prepared Bottles – 10 × 200 mL
299102 Prepared Bottles – 10 × 500 mL

Europe

Cat. No. 254483 Prepared Plates – Pkg. of 20*

Japan

Cat. No. 251536 Prepared Plates – Pkg. of 20*
251543 Prepared Plates – Ctn. of 100*
251546 Prepared Plates (150 × 15 mm-style) – Pkg. of 24*
251506 Prepared **RODAC™** Plates – Pkg. of 30*

Mexico


Cat. No. 252634 Prepared Bottles, 140 mL – Pkg. of 12


*Store at 2-8°C.

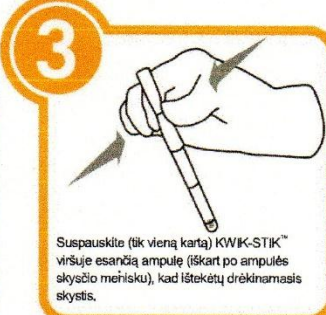
Anexo D: Procedimiento de activación de la cepa en formato KWIK-STIK




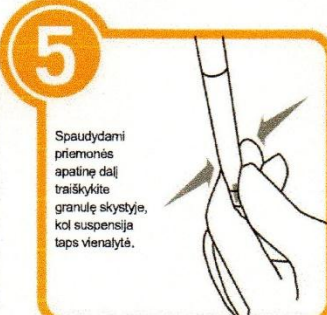
ILIUSTRUOTOS INSTRUKCIJOS


- 


Leiskite neatplėsto KWIK-STIK™ maišiuo temperatūrai susivienodinti su kambario temperatūra. Ties įpjova atplėskite maišiuoką ir išimkite KWIK-STIK™.
- 


Nuplėškite etiketės dalį „Pull-Tab“ ir prijukite ją prie piminės kultūros lėkštelės arba kokybės kontrolės dokumento. Drėkinimo metu įtaisą neardykite.
- 

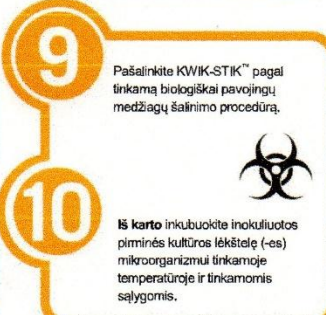
Suspauskite (tik vieną kartą) KWIK-STIK™ viršuje esančią ampulę (iškart po ampulės skysčio mešišku), kad ištekėtų drėkinamasis skystis.
- 

Laikydami vertikaliai pastuksenkite į kietą paviršių, kad skystis lengviau nutekėtų vamzdeliu į apatinę dalį, kurioje yra granulė. Leiskite drėkinamajam skysčiui tekėti per kempinėlę į apatinę priemonės dalį, kurioje yra granulė.
- 


Spaudydami priemonės apatinę dalį traišykite granulę skystyje, kol suspensija taps vienalytė.
- 

Iš karto sudrėkinkite kempinėlę dideliu kiekiu drėkinamojo skysčio ir perkelkite į agaro terpę arba panaudokite pagal laboratorijos praktikos standartus.
- 

Inokuluokite piminės kultūros lėkštelę (-es) švelniai pavoliodami kempinėlę ant trečdaliao lėkštelės paviršiaus.
- 

Sterilia kipele pabraukykite, kad kolonija būtų atskirta.
- 

Pašalinkite KWIK-STIK™ pagal tinkamą biologškai pavojingų medžiagų šalinimo procedūrą.


-

Iš karto inkubuokite inokuluotos piminės kultūros lėkštelę (-es) mikroorganizmui tinkamoje temperatūroje ir tinkamomis sąlygomis.

 **Microbiologics®**
A safer, healthier world.

Anexo E: Conservación bacteriana

IDENTIFICACIÓN: *R. pickettii* **CÓDIGO:** ATCC 700591

ORIGEN:

Activada por	Kevin Veloz Cando
Fecha de ingreso	05 de septiembre de 2017

CARACTERÍSTICAS:

Macroscópicas	Colonias pequeñas, redondas con bordes enteros, apariencia brillante, cremosa de color blanco.
Microscópicas	bacilo
Bioquímicas	Gram negativo, oxidasa positivo
Fisiológicas	Oligotrófica, no fermentativa

CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO:

CONDICIONES	CRECIMIENTO	MANTENIMIENTO
Temperatura:	35°C	-20 °C
pH:	6.5-7.5	6.5-7.5
Medio de Cultivo:	Agar nutritivo	Caldo nutritivo
Incubación:	48 horas	-

Preservante: Glicerol 30 % v/v

VIABILIDAD:

Localización	Fecha de conservación	Fecha de Evaluación	Resultado de Viabilidad
Congelación -20°C	05/08/2017	-	-

Anexo F: Procedimiento de medición de Cr VI con reactivo HACH

Utilizando sobres de reactivo en polvo



1. Llenar una cubeta de 10 mL hasta la marca de 10 mL con muestra.



2. Añadir el contenido de un sobre de reactivo ChromaVer 3 en polvo (la muestra preparada). Tapar la cubeta.

Nota:
En caso de que hubiese una concentración de cromo elevada, se formará un precipitado. Diluir la muestra.



3. Esperar como mínimo 5 minutos.

Nota:
En presencia de cromo hexavalente, aparecerá un color violeta.



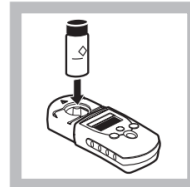
4. Llenar otra cubeta de 10 mL hasta la marca de 10 mL con muestra (el blanco). Tapar la cubeta.

Nota:
Para las muestras turbias, tratar 25 mL muestra (por el blanco) con el contenido de un sobre de reactivo ácido. Este reactivo disolverá en el blanco la turbidez disuelta por el ácido contenido en el reactivo ChromaVer 3 en la muestra preparada.



5. Pulsar la tecla **POWER** para encender el medidor.

Nota:
La flecha de la pantalla deberá indicar el canal mg/L Cr⁶⁺. Véase la página 2-6 para obtener información sobre la selección del canal del rango correcto.



6. Limpiar bien el exterior de la cubeta.

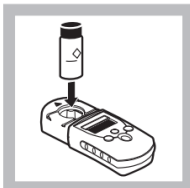
Colocar el blanco en el soporte portacubetas, con la marca del diamante mirando hacia el teclado.

Colocar la tapa del instrumento sobre el compartimento de cubetas para tapar la cubeta.



7. Pulsar la tecla **ZERO/SCROLL**.

La pantalla indicará "----" y, a continuación, "0.00". Retirar el blanco.



8. Limpiar bien el exterior de la cubeta.

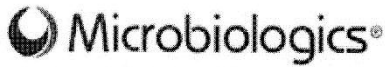
Colocar la cubeta con la muestra preparada en el soporte portacubetas. Colocar la tapa del instrumento sobre el compartimento de cubetas para tapar la cubeta.



9. Pulsar la tecla **READ/ENTER**.

La pantalla indicará "----" y, a continuación de los resultados en mg/L de cromo, hexavalente (Cr⁶⁺).

Anexo G: Certificado de análisis cepa ATCC 700591



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Ralstonia pickettii Catalog Number: 01197 Lot Number: 1197-02 Reference Number: ATCC® 700591™* Purity: <0.1% of Total Pellet CFU Recovery: >1000 CFUs per pellet Passage from Reference: 4		Expiration Date: 2018/4/30 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2016/7/11
Performance		
Macroscopic Features: Small, circular, entire edges, grey, glossy appearance Microscopic Features: Gram negative rods	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)	
ID System: Vitek GN (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): positive (1) Nitrate (Broth): positive (1) Motility B Medium: positive	 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
<p><small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <p><small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p> <p><small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p>		
  TESTING CERT #2655.01		

MEDIBAC-INC S.A.
 Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
 Registro Sanitario AD-541-04-13

bioMerieux Customer: 1012555
System #: 521711

Laboratory Report

Printed Jul 7, 2016 09:13 CDT
Printed by: cjs

Isolate Group: 1197 02-1

Bench: CS

Card Type: GN Testing Instrument: 000017919CE3 (15220)

Bionumber: 4043003303501001
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 241370540	Expires: Feb 4, 2017 12:00 CST
	Completed: Jul 6, 2016 14:10 CDT	Status: Final	Analysis Time: 5.00 hours
Selected Organism	98% Probability Ralstonia pickettii		Confidence: Excellent identification
SRF Organism	Bionumber: 4043003303501001		
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			
Ralstonia pickettii LIP(19),			

Biochemical Details																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	+	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	+	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	+	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	+	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			



Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified: