

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**TESIS**

**EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Bacillus* sp. CON CAPACIDAD DE  
ADSORBER PLOMO(II), AISLADOS DEL SUELO DE LA RIBERA  
DEL RÍO SALADO (ESPINAR – CUSCO)**

**PRESENTADA POR:**

Bach. Irma Lizbeth Vega Richarte

Bach. Angela Graciela Curillo Suarez

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL  
DE BIÓLOGO**

**ASESORA:**

Dra. Julia Griselda Muñiz Duran

**CUSCO - PERÚ**

**2024**

# INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, Asesor del trabajo de investigación/tesis titulada: EVALUACIÓN DE  
CEPAS DE Bacillus sp. CON CAPACIDAD DE ADSORBER  
PLOMO (II) , AISLADOS DEL SUELO DE LA RIBERA  
DEL RÍO SALADO (ESPINAR- CUSCO)

presentado por: IRMA LIZBETH VEGA RICHARTE con DNI Nro.: 72470320 presentado  
por: ANGELA GRACIELA CURILLO SUAREZ con DNI Nro.: 72553366 / para optar el  
título profesional/grado académico de BIOLOGO

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 01 veces, mediante el  
Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la**  
**UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 9 %.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o  
título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	<input checked="" type="checkbox"/>
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	<input type="checkbox"/>
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	<input type="checkbox"/>

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 12 de noviembre de 2024

[Firma]  
Firma  
Post firma Jelis Garsella Huñiz Duen

Nro. de DNI 23822964

ORCID del Asesor 0000-0001-9988-4827

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: 27259:404425960

NOMBRE DEL TRABAJO

**TESIS VEGA Y CURILLO.pdf**

RECUENTO DE PALABRAS

**26973 Words**

RECUENTO DE CARACTERES

**150472 Characters**

RECUENTO DE PÁGINAS

**162 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**6.8MB**

FECHA DE ENTREGA

**Nov 11, 2024 6:23 PM GMT-5**

FECHA DEL INFORME

**Nov 11, 2024 6:25 PM GMT-5****● 9% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 7% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 5% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

**● Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos en primer lugar a Dios, quien nos ha inspirado y fortalecido con sabiduría y resiliencia en cada fase de este proceso para alcanzar una de las metas más anheladas de nuestra carrera universitaria.

Agradecemos a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), por brindarnos la oportunidad de cursar nuestra carrera profesional y por inculcarnos valores a lo largo de nuestra experiencia universitaria, asimismo extendemos nuestro agradecimiento a cada uno de los docentes de la carrera profesional de Biología por su orientación y compromiso firme en nuestra formación como profesionales.

Queremos manifestar nuestra profunda gratitud a la Dra. Julia Griselda Muñiz Duran por su orientación experta, apoyo incondicional y dedicación durante todo el desarrollo de esta investigación. Sus conocimientos y enfoques únicos fueron clave para la realización de esta tesis. Agradecemos especialmente su paciencia y disposición para escuchar nuestras ideas, así como sus sugerencias y correcciones, las cuales han enriquecido significativamente nuestro proyecto. Su compromiso y profesionalismo han sido una inspiración para nosotras y han contribuido de manera decisiva a nuestro desarrollo académico. Además, estamos agradecidas porque nos brindó el espacio en las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular para llevar a cabo nuestra investigación.

A la Msc. Olga Libia Cjuno Huanca por su gran apoyo, orientación y su infinita paciencia durante todo este proceso. Su cálida amistad no solo nos ha guiado como investigadores, sino que también nos ha inspirado a crecer como personas. Valoramos profundamente su compromiso con nuestro desarrollo académico y personal, así como su constante disposición para brindarnos su sabiduría y experiencia

Al Msc. Hans Carreño Fernández por su inestimable guía a lo largo de nuestra investigación, su apoyo constante y las enseñanzas que tanto aportaron al desarrollo de nuestro

trabajo. También valoramos profundamente la oportunidad que nos brindó al facilitarnos el uso de las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología, lo que fue esencial para llevar a cabo este proyecto. Su dedicación y compromiso fueron pilares fundamentales en cada fase de nuestro estudio, y le expresamos nuestro más sincero reconocimiento.

Al químico J. Americo Cjuno Huanca por su orientación y además por permitirnos realizar parte de la investigación del análisis químico de nuestro trabajo de investigación en sus instalaciones (Fractal Químicos E.I.R.L - Cusco).

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mis amados padres, Lorenzo Vega y Celia Richarte, en reconocimiento a su amor, sacrificio y apoyo incondicional, que han sido esenciales en mi desarrollo personal. Ellos han sido mi refugio y mi principal fuente de fortaleza. Esta tesis es un homenaje a la profunda admiración y gratitud que siento por ellos. También quiero agradecer a mis hermanas, Blessy Judy y Anel Jazmín, por su cariño y apoyo constante durante este proceso. Asimismo, expreso mi gratitud a Kiev Zevallos y Shiomara Fernández, quienes me han alentado a alcanzar mis metas y han sido un apoyo emocional importante.

*Irma Lizbeth Vega Richarte*

A mis padres Agustina Suarez y Edgar Curillo por el inquebrantable apoyo que recibí durante mi formación académica tanto económica como afectivamente, siempre brindándome palabras de aliento y fortaleza. A mi tía Sonia Suarez, por ser un pilar constante desde mi niñez hasta la actualidad.

A mi hermana Andrea Curillo por su afectuosa cercanía y estar a mi lado cuando más lo necesito. A mi enamorado Kevin Rivas, por su continuo apoyo.

*Angela Graciela Curillo Suarez*

## ÍNDICE

RESUMEN .....	I
INTRODUCCIÓN .....	III
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	V
JUSTIFICACIÓN .....	VII
OBJETIVOS.....	VIII
HIPÓTESIS .....	IX
Variables.....	X
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO .....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES .....	1
1.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES .....	4
1.1.3 ANTECEDENTES LOCALES.....	5
1.2 MARCO CONCEPTUAL .....	8
1.2.1 Contaminación Ambiental .....	8
1.2.2 Metales Pesados .....	8
1.2.3 Efecto de los metales pesados en el ambiente .....	9
1.2.4 Plomo.....	10
1.2.5 Biorremediación por Medio de Microorganismos .....	12
1.2.6 Resistencia Bacteriana a Metales Pesados.....	19
1.2.7 Determinantes Genéticos de Resistencia .....	20
1.2.8 Biodisponibilidad .....	20
1.2.9 <i>Bacillus</i> como material adsorbente .....	21
1.2.10 Identificación de <i>Bacillus</i> sp.....	25
1.2.11 Principios de medición para cuantificar la adsorción.....	29
1.2.12 Estándar de calidad ambiental (ECA) .....	32
1.2.13 Ubicación política del río Salado (Espinar-Cusco).....	32
CAPITULO II: MATERIAL Y METODOLOGÍA.....	36
2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN .....	36
2.2 ÁREA DE ESTUDIO.....	36
2.3 MATERIALES .....	36
2.3.1 Material biológico .....	36
2.3.2 Materiales de campo.....	37
2.3.3 Materiales de laboratorio .....	37
2.3.4 Material de vidrio .....	38
2.3.5 Medios de cultivo.....	39
2.3.6 Reactivos.....	39

2.3.7 Equipos de laboratorio.....	39
2.4 METODOLOGÍA .....	40
2.4.1 Tipo de investigación .....	40
2.4.2 Flujograma de la investigación .....	41
2.5 MÉTODOS .....	42
2.5.1 Determinación de la concentración de plomo en las 02 muestras de suelo tomadas de la ribera del Río Salado (Espinar-Cusco). .....	42
2.5.2 Aislamiento e identificación de cepas de <i>Bacillus</i> sp. en base a sus características morfológicas, bioquímicas y moleculares .....	44
2.5.3 Determinación de la tolerancia máxima de <i>Bacillus</i> sp. en diferentes concentraciones de Pb (II).....	48
2.5.4 Determinación de la capacidad y la eficiencia (%) de <i>Bacillus</i> sp. en la adsorción de Pb (II).....	51
2.5.5 Diseño experimental.....	55
2.5.6 Análisis estadístico .....	56
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	57
3.1 Determinación de la concentración de plomo en 02 muestras de suelo tomadas de la ribera del río Salado (Espinar-Cusco).....	57
3.2 Aislamiento e identificación bioquímica y molecular de cepas de <i>Bacillus</i> sp .....	61
3.2.1 Cultivo para cepas de <i>Bacillus</i> sp.....	61
3.2.2 Aislamiento de cepas de <i>Bacillus</i> sp. ....	63
3.2.3 Tinciones.....	64
3.2.4 Identificación bioquímica .....	67
3.2.5 Identificación molecular .....	68
3.3 Determinación de la tolerancia máxima de <i>Bacillus</i> en diferentes concentraciones de Pb (II). .....	73
3.4 Determinación de la capacidad y eficiencia de <i>Bacillus</i> sp. en la adsorción de Pb(II).....	76
3.4.1 Obtención de biomasa seca de <i>B. thuringiensis</i> (C0001), <i>B. cereus</i> (C0002), <i>B. mycooides</i> (C0005) y <i>B. thuringiensis</i> (C0012) .....	76
3.4.2 Trazabilidad de la curva de calibración para las lecturas de Pb(II) .....	77
3.4.3 Determinación de la capacidad y eficiencia de adsorción de las cepas de <i>Bacillus</i> sp .....	78
3.5 Análisis estadístico .....	81
3.5.1 Prueba de normalidad.....	81
3.5.2 Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para capacidad de adsorción .....	83
3.5.3 Análisis bifactorial ANOVA entre las interacciones de las variables para evaluar la capacidad de adsorción.....	84
3.5.4 Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para la eficiencia de adsorción .....	86
3.5.5 Análisis bifactorial ANOVA entre las interacciones de las variables para evaluar la eficiencia de adsorción.....	88

CONCLUSIONES .....	90
RECOMENDACIONES .....	91
BIBLIOGRAFÍA .....	92
ANEXOS.....	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Mecanismos de interacción entre microorganismos y metales pesados. ....	13
<b>FIGURA 2.</b> Principios de eliminación o recuperación de metales en soluciones acuosas mediante biomasa microbiana .....	16
<b>FIGURA 3.</b> Características morfológicas de <i>Bacillus</i> sp. de la colección de microorganismos .....	22
<b>FIGURA 4.</b> Estructura bioquímica de la pared celular de las bacterias Gram Positivas y Gram Negativas .....	23
<b>FIGURA 5.</b> Ciclo de reproducción de esporas en el género <i>Bacillus</i> .....	25
<b>FIGURA 6.</b> Mecanismo de lecturas nefelométrica y turbidimetría.....	30
<b>FIGURA 7.</b> Flujograma de métodos para la evaluación de cepas de <i>Bacillus</i> sp con capacidad de adsorber plomo (II), aislados de la ribera del río Salado (Espinar – Cusco).....	41
<b>FIGURA 8.</b> Muestras aisladas en agar nutritivo, enviadas a la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en la ciudad de Lima para su identificación molecular .....	46
<b>FIGURA 9.</b> Exposición de biomasa seca a concentraciones diferentes de Pb (II).....	53
<b>FIGURA 10.</b> Cuantificación de 25 metales en las 02 muestras de suelo obtenidas de la ribera del río Salado de la provincia de Espinar - Cusco, por el método de Espectrometría de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).....	58
<b>FIGURA 11.</b> Niveles de referencia para metales pesados a nivel internacional .....	59
<b>FIGURA 12.</b> Cultivo de <i>Bacillus</i> sp en medio de cultivo MYP (Manitol Yema de Huevo Polimixina) a 48 horas de incubación con una temperatura de 36°C .....	62
<b>FIGURA 13</b> Aislamiento y purificación de cepas de <i>Bacillus</i> sp. en agar manitol yema de huevo polimixina (MYP).....	63
<b>FIGURA 14.</b> Observación microscópica de cepas Gram Positivas en un aumento de 1000X .....	65
<b>FIGURA 15.</b> Tinción Shaeffer-Ffulton para la observación de esporas a un aumento de 1000X.....	66
<b>FIGURA 16.</b> Geles de electroforesis mostrando la calidad de las 04 muestras de ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	69
<b>FIGURA 17.</b> Gel de electroforesis que muestra los productos de ADNr 16S amplificados por PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.....	70
<b>FIGURA 18.</b> Árbol filogenético de las 04 cepas: <i>B. thuringiensis</i> (C0001), <i>B. cereus</i> (C0002), <i>B. mycoides</i> (C0005) y <i>B. Thuringiensis</i> (C0012) .....	72
<b>FIGURA 19.</b> Lectura del cultivo de agar nutritivo enriquecido con 300, 700 Y 1000 ppm de Pb(II) .....	75
<b>FIGURA 20.</b> Biomasa Seca: <i>B. thuringiensis</i> (C0001), <i>B. cereus</i> (C0002), <i>B. mycoides</i> (C0005) y <i>B. thuringiensis</i> (C0012).....	77

<b>FIGURA 21.</b> Recta de calibración del equipo espectrofotométrico para el análisis adsorción de Pb(II).....	78
<b>FIGURA 22.</b> Eficiencia de adsorción de Pb(II) expresado en (%) de <i>B. thuringiensis</i> (C0001), <i>B. cereus</i> (C0002), <i>B. mycooides</i> (C0005) y <i>B. thuringiensis</i> (C0012) aisladas del suelo de la ribera del río Salado (Espinar-Cusco).....	80
<b>FIGURA 23.</b> Prueba de normalidad en el paquete estadístico SPSS - Versión 29.0.....	82
<b>FIGURA 24.</b> Prueba de Kruskal-Wallis en diagrama de cajas para la capacidad de adsorción de Pb(II), variable cepa .....	83
<b>FIGURA 25.</b> Prueba de Kruskal-Wallis en diagrama de cajas para la capacidad de adsorción de Pb(II), variable concentración (50 ppm, 100 ppm y 150 ppm).....	84
<b>FIGURA 26.</b> Interacción para la capacidad de adsorción entre las variables cepa y concentración de Pb(II) .....	85
<b>FIGURA 27.</b> Prueba de Kruskal-Wallis en diagrama de cajas para la eficiencia de adsorción de Pb(II), variable cepa .....	87
<b>FIGURA 28.</b> Prueba de Kruskal-Wallis en diagrama de cajas para la eficiencia de adsorción de Pb(II), variable concentración (50 ppm, 100 ppm y 150 ppm).....	87
<b>FIGURA 29.</b> Interacción para la eficiencia de adsorción entre las variables cepa y concentración de Pb(II) .....	89

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Identificación bioquímica para diferentes especies del género <i>Bacillus</i> .....	28
<b>TABLA 2.</b> Estándares de calidad ambiental para el plomo en agua y suelo Perú (MINAM, 2017) .....	32
<b>TABLA 3.</b> Puntos de muestreo ubicados en la provincia de Espinar, distrito Alto Pichigua	42
<b>TABLA 4.</b> Primers universales para la amplificación de la región 16S.....	47
<b>TABLA 5.</b> Programa de la amplificación molecular.....	47
<b>TABLA 6.</b> Determinación de las equivalencias en (g) de Pb a partir de nitrato de $Pb(NO_3)_2$	50
<b>TABLA 7.</b> Calibración de espectrofotómetro 355nm de longitud.....	54
<b>TABLA 8.</b> Diseño experimental para evaluar las cepas de <i>Bacillus</i> sp. con capacidad de adsorber plomo(II), aislados del suelo de la ribera del río Salado (Espinar-Cusco).....	56
<b>TABLA 9.</b> Concentración de plomo en 02 muestras de suelo en la ribera del río Salado en la provincia de Espinar.....	57
<b>TABLA 10.</b> Estándares de calidad ambiental para metales pesados a nivel internacional ....	59
<b>TABLA 11.</b> Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) de <i>Bacillus</i> sp. a las 24 y 48 horas de crecimiento en agar manitol yema de huevo polimixina (MYP).....	61
<b>TABLA 12.</b> Tinciones diferenciales: coloración Gram y coloración Schaeffer-Ffulton .....	64
<b>TABLA 13.</b> Identificación bioquímica para 04 cepas Gram Positivas y esporuladas, aisladas de la ribera del río Salado de la provincia de Espinar.....	68
<b>TABLA 14.</b> Medidas de la concentración de ADN y pureza de las muestras del género <i>Bacillus</i> sp.....	69
<b>TABLA 15.</b> Identificación molecular de las 04 cepas de <i>Bacillus</i> sp. identificadas bioquímicamente.....	71
<b>TABLA 16.</b> Tolerancia de las 04 cepas identificadas como <i>Bacillus</i> a concentraciones crecientes de Pb (II) .....	73
<b>TABLA 17.</b> Peso neto promedio de biomasa seca obtenida a partir de <i>Bacillus</i> .....	76
<b>TABLA 18.</b> Adsorción de Pb(II) por las 04 cepas del género <i>Bacillus</i> en términos de capacidad y eficiencia .....	79
<b>TABLA 19.</b> Prueba de Kruskal - Wallis para contrastar las medianas de la variable cepa y concentración.....	83
<b>TABLA 20.</b> Análisis de varianza bifactorial ANOVA para la capacidad de adsorción de Pb(II), variables cepa y concentración de Pb(II) .....	85
<b>TABLA 21.</b> Prueba de Kruskal-Wallis para contrastar las medianas de la variable cepa y concentración.....	86
<b>TABLA 22 .</b> Análisis de varianza bifactorial ANOVA para la eficiencia de adsorción de Pb(II), variables cepa y concentración de Pb(II). .....	88

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO N° 1</b> Fotografías de la evaluación de cepas de <i>Bacillus</i> sp. con capacidad de adsorber plomo(II), aislados del suelo de la ribera del río Salado (Espinar-Cusco).....	106
<b>ANEXO N° 2</b> Barrido de 25 metales por el método de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente-CERPER Lima .....	113
<b>ANEXO N° 3</b> Identificación molecular en la unidad genómica de la Universidad Cayetano Heredia Lima .....	115
<b>ANEXO N° 4</b> Experimentos para la adsorción de Pb (II) (capacidad y eficiencia) con cepas de <i>Bacillus</i> . Fractal Químicos E.I.R.L - Cusco.....	126
<b>ANEXO N° 5</b> Decreto Supremo N°011-2017-MINAM .....	134

## RESUMEN

El presente estudio abordó el tema de la adsorción de plomo utilizando bacterias del género *Bacillus*, como estrategia innovadora de biorremediación. El objetivo principal fue evaluar las cepas del género *Bacillus* con capacidad de adsorber plomo (II), aisladas de 02 muestras de suelo tomadas en la ribera del río Salado en el distrito de Espinar. Se empleó una metodología con enfoque mixto, de tipo experimental. Tras un barrido de 25 metales de cada punto de muestreo seleccionadas en base a la coloración que presentaban las aguas del río Salado, se encontró que uno de los metales en mayor proporción es el plomo con una concentración de 11,31 mg/kg para el punto de muestra 1 y 18,12 mg/kg para el punto de muestra 2. Luego se procedió con el cultivo, aislamiento, identificación bioquímica (Tinción Gram, tinción Shaffer Ffulton y batería bioquímica) e identificación molecular mediante el análisis del ADNr 16S. Se identificaron las cepas de *Bacillus thuringiensis* (C0001), *Bacillus cereus* (C0002), *Bacillus mycoides* (C0005) y *Bacillus thuringiensis* (C0012). Posteriormente, se evaluó la tolerancia a las cepas ya mencionadas frente a diferentes concentraciones de Pb (II) (300ppm, 700ppm y 1000ppm), determinando que la concentración óptima de crecimiento fue de 300ppm puesto que se obtuvo un mediano (++) y alto crecimiento (+++), donde *Bacillus cereus* (C0002) mostró la mayor tolerancia en todas las concentraciones con relación a las demás cepas. Para las pruebas de adsorción se preparó biomasa seca a una concentración promedio de 0,1 g por cepa, la cual se sometió a experimentos de adsorción utilizando 0,01 g de biomasa seca con 2 mL de solución de plomo (II) a concentraciones crecientes (50,100 y 150 ppm), a pH de 4,2 y 24°C en agitación continua de 150 rpm por 2 horas. La capacidad y eficiencia de adsorción se determinaron mediante lecturas espectrofotométricas. Los resultados mostraron que *Bacillus thuringiensis* (C0001) tiene una capacidad de adsorción (9,61mg/g en 50ppm, 17,13 mg/g en 100ppm y 24,00 mg/g en 150 ppm), y una eficiencia de adsorción (99,80% en 50ppm, 90,33% en 100ppm y 82,86% en 150ppm); *Bacillus cereus* (C0002) con una capacidad de adsorción

( 9,61mg/g en 50ppm, 17,63 mg/g en 100ppm y 24,30 mg/g en 150ppm) y una eficiencia de adsorción (99,80% para 50ppm, 92,33% para 100ppm y 83,68% para 150ppm); *Bacillus mycoides* (C0005) con una capacidad de adsorción (9,61mg/g en 50ppm, 14,47mg/g en 100ppm y 23,70 en 150ppm) y una eficiencia de adsorción (99,80% para 50ppm, 76,77% para 100ppm y 82,60% para 150ppm) y por ultimo *Bacillus thuringiensis* (C0012) con una capacidad de adsorción (9,61mg/g en 50ppm, 16,80mg/g en 100ppm y 23,57 en 150ppm) y una eficiencia de adsorción (99,80% para 50ppm, 82,80% para 100ppm y 82,44% para 150ppm). *Bacillus cereus* (C0002) exhibió la mayor capacidad y eficiencia de adsorción para todas las concentraciones evaluadas de Pb(II). Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para analizar las diferencias en la capacidad y eficiencia de adsorción entre las variables. Se encontraron diferencias significativas en la concentración de plomo ( $p = 0,000$ ), pero no hubo diferencias significativas en la capacidad de adsorción según la variable cepa ( $p = 0,897$ ), tampoco en la eficiencia de adsorción ( $p = 0,330$ ). Mediante un análisis de varianza ANOVA, se confirmaron diferencias significativas ( $p = 0,003$ ) para la interacción entre las variables cepa y concentración de Pb (II) aceptando la hipótesis alterna (H1). Esto indica que la capacidad de adsorción y su eficiencia varían según las concentraciones de plomo y las especies de *Bacillus* analizadas.

Palabras clave: *Bacillus*, adsorción, plomo, capacidad, eficiencia.

## INTRODUCCIÓN

En la provincia de Espinar, la actividad minera tiene un impacto significativo en la calidad del ambiente, según CooperAcción y Oxfam (2023). Este fenómeno desencadena una alteración de la cadena trófica, lo cual representa un riesgo para la salud y la seguridad alimentaria de los seres vivos. En los últimos estudios de impacto ambiental se determinaron altas concentraciones de metales pesados: Plomo (Pb), Mercurio (Hg), Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cobre (Cu) y Cobalto (Co) en muestras de suelos y agua, por consiguiente, las comunidades rurales asentadas de las zonas presentan un riesgo de exposición alto y toxicidad crónica (Osore, 2016).

El plomo (Pb) ha sido clasificado por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) en el grupo 2B, lo que indica su posible absorción por organismos vivos tanto a través de la ingestión como por contacto con la piel, con efectos tóxicos y potencialmente teratogénicos (AESAN, 2021). La contaminación de suelos y aguas con metales pesados, como el plomo, puede alterar los consorcios microbianos, promoviendo la selección de genotipos bacterianos que desarrollan mecanismos de resistencia para tolerar el estrés ambiental y adaptarse a estas condiciones adversas (Dueñas y Quispe, 2011).

Los mecanismos de resistencia bacteriana constituyen estrategias clave para la remediación de ambientes contaminados. Entre estos mecanismos se encuentran procesos como la adsorción, la bioacumulación, la biomineralización y la biotransformación, los cuales implican interacciones electrostáticas, intercambio iónico, adsorción fisicoquímica y microprecipitación (Sanga, 2016).

La adsorción es un proceso en el que microorganismos, como las bacterias del género *Bacillus*, interactúan con iones metálicos, formando complejos a través de intercambio iónico o precipitación. Esta interacción se produce en la pared celular, donde los iones se unen a grupos funcionales, reduciendo así la biodisponibilidad de los metales (Bautista, 2008). Las

bacterias *Bacillus* son Gram positivas, esporuladas y poseen una pared celular de peptidoglucano con sitios carboxilo y grupos fosforilo, fundamentales para la adsorción (Mena y Rafael, 2017).

La problemática de la contaminación por plomo en la provincia de Espinar ha suscitado un creciente interés en la remediación de ambientes afectados. En este contexto, el uso de microorganismos bacterianos emerge como una alternativa prometedora, dada su rentabilidad económica, su impacto ambiental reducido y su eficacia. El objetivo principal de este estudio fue evaluar las cepas de *Bacillus* sp. con capacidad de adsorber plomo (II), aislados de la ribera del río Salado (Espinar-Cusco).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La provincia de Espinar, con una población estimada de entre 69,000 y 70,000 habitantes, se ubica a 15 km de Yauri y a 255 km de Cusco y Arequipa (MINEM, 2019). En esta región, varias zonas mineras dedicadas a la extracción de cobre son de gran importancia por el desarrollo económico local. Sin embargo, ha traído consigo graves problemas ambientales. La contaminación del suelo, los ríos y los canales de riego ha afectado negativamente las actividades agrícolas y agropecuarias locales. Como resultado, los pobladores han intensificado sus protestas en los últimos años, exigiendo acciones para mitigar los impactos adversos de la minería, especialmente en las subcuencas de los ríos Cañipia y Salado (Huamani, 2015).

La contaminación de fuentes de agua y suelos por metales pesados y otros contaminantes ha aumentado, en parte debido a la disposición final de desechos de minería, agricultura y ganadería en los ríos (Correa O. et al., 2021). Aunque la flora microbiana acuática y terrestre puede manejar pequeñas cantidades de metales pesados como elementos traza necesarios para su funcionamiento celular, concentraciones superiores a los niveles fisiológicos tolerables resultan tóxicas para la mayoría de los microorganismos. Este exceso de metales pesados no solo puede eliminar algunas cepas bacterianas, sino que también puede seleccionar cepas resistentes capaces de sobrevivir en condiciones adversas (Dueñas y Quispe, 2011).

Ciertos microorganismos poseen una capacidad de adaptarse a ambientes con factores extremos, dentro de este grupo existen bacterias con la capacidad de adsorber metales pesados entre los que se encuentran consorcios microbianos del género *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Chrseobacterium* capaces de adsorber plomo (Pb) (Glibota, 2019). Resultando ser un potencial de aprovechamiento para remediar ambientes contaminados (Aquino y Checcori, 2021).

Frente a lo expuesto nos planteamos las siguientes interrogantes:

### **Problema general**

¿Cuáles son las cepas de *Bacillus* sp. capaces de adsorber plomo (II), aisladas del suelo de la ribera del río Salado Espinar – Cusco?

### **Problema específico**

- ¿Cuál es la concentración de plomo en el suelo de la ribera del río Salado (Espinar - Cusco)?
- ¿Qué cepas de *Bacillus* sp. fueron identificadas a partir de 02 muestras de suelo obtenidas en la ribera del río Salado (Espinar-Cusco)?
- ¿Cuál es la tolerancia máxima de las cepas de *Bacillus* sp. frente a diferentes concentraciones de Pb (II)?
- ¿Qué cepa de *Bacillus* sp. fue más capaz y eficiente en la adsorción de Pb (II)?

## JUSTIFICACIÓN

La actividad minera y la gestión inadecuada de residuos han jugado un papel importante en la acumulación de metales pesados en el suelo, lo que representa un grave problema ambiental. Estos metales, una vez acumulados, persisten en el ambiente debido a procesos como la lixiviación y la absorción por parte de las plantas, contaminando así las fuentes de agua subterránea y afectando la agricultura circundante (Fernandez et al., 2022). Esta contaminación impacta negativamente en la flora y fauna local, así como en la calidad del ambiente (CooperAcción y Oxfam, 2023).

En este contexto, se hace necesario buscar microorganismos que puedan mitigar la contaminación en aguas y suelos. Se ha identificado un grupo de bacterias ampliamente distribuidas, destacando el género *Bacillus*, que posee la capacidad de adsorber metales pesados, incluido el plomo. Esta característica convierte a *Bacillus* en un candidato prometedor para el tratamiento de suelos contaminados, ya que estas cepas nativas están adaptadas a las condiciones locales y son fáciles de manejar in vitro, lo que las hace económicamente viables (Muñoz-Silva et al., 2019).

La presente tesis no solo se alinea con los objetivos de desarrollo sostenible ODS 15 “Vida de ecosistemas terrestres”, sino que también establece las bases para futuras investigaciones en biotecnología. Ofrece soluciones más sostenibles para combatir la contaminación por metales pesados en ambientes terrestres y acuáticos, lo cual es esencial para la conservación de los ecosistemas fluviales. La recuperación de estos ecosistemas podría beneficiar la restauración de especies endémicas. Así, mejorar la calidad ambiental del río Salado mediante la mitigación del plomo y podría impactar positivamente la biodiversidad regional. Por ello el presente trabajo se justifica, para evaluar la capacidad de adsorción de plomo por parte de *Bacillus* sp. presentes en el suelo de la ribera del río Salado (Espinar-Cusco).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar cepas de *Bacillus* sp. con capacidad de adsorber plomo (II), aislados del suelo de la ribera del río Salado (Espinar-Cusco).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la concentración de plomo en 02 muestras de suelo tomadas de la ribera del río Salado (Espinar-Cusco).
2. Aislar e identificar cepas de *Bacillus* sp. a partir de 02 muestras de suelo obtenidas en la ribera del río Salado (Espinar-Cusco).
3. Determinar la tolerancia máxima de *Bacillus* sp. en diferentes concentraciones de Pb (II).
4. Determinar la capacidad y eficiencia de *Bacillus* sp. en la adsorción de Pb (II)

## **HIPÓTESIS**

Las cepas de *Bacillus* sp. aisladas de las 02 muestras de suelo de la ribera del río Salado, en Espinar - Cusco, exhiben una notable capacidad de adsorción de plomo (II).

## Variables

### V. dependiente:

- Plomo adsorbido (Capacidad y eficiencia de adsorción)

Descripción: Cantidad de iones de plomo adsorbido por las cepas de *Bacillus* sp.

(Expresados en capacidad mg/g de biomasa y % de eficiencia)

### V. independiente:

- Cepas de *Bacillus* sp.

Descripción: Las diferentes cepas de *Bacillus* sp. aisladas de la ribera del río Salado.

- Concentración de Pb (II).

Descripción: Las diferentes concentraciones de plomo presentes en el experimento de adsorción

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1 ANTECEDENTES

#### 1.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Bautista (2008) estudió la capacidad de microorganismos para adsorber metales pesados en jales mineros en Zacualpan y El Oro de Hidalgo, México, con el objetivo de evaluar la capacidad de adsorber metales pesados por una cepa bacteriana. Los microorganismos se cultivaron en caldo nutritivo con metales pesados (Al, Cu, Pb, Zn, Ni, Se) y se aislaron en agar nutritivo. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la bioacumulación se evaluaron, identificando la cepa "ZnZac4" como la más resistente frente a zinc (Zn) y plomo (Pb). Esta cepa mostró un equilibrio en la adsorción de zinc a los 40 minutos y de plomo a los 20 minutos. La máxima capacidad de adsorción fue de 0,216 mmol/g para plomo y 0,207 mmol/g para zinc, con un ajuste óptimo al modelo de Langmuir y un pH óptimo de 6 para zinc. La cepa "ZnZac4" presentó una capacidad media para zinc y alta para plomo en comparación con otros materiales.

Tur-Naranjo et al. (2012) en Cuba evaluaron el efecto del pH en la bioadsorción de Pb (II) por tres especies microbianas: *Bacillus subtilis* CCEBI 1032, *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 y *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044. La metodología incluyó cultivo y aislamiento de microorganismos, producción de biomasa seca y medición de adsorción usando Espectroscopia Óptica de Emisión Atómica mediante Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES). Los resultados mostraron que el pH influye significativamente en la capacidad de adsorción. *Bacillus subtilis* CCEBI 1032 alcanzó una eficiencia de 83,1% y 29,1% a pH 4,2 y 5,2 respectivamente; *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044 mostró una eficiencia de 95% y 97,4% a los mismos pH; y *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 con una eficiencia de 97,2% y 93% a pH 4,2 y 5,2 siendo la más efectiva en la adsorción de Pb (II). El estudio resalta la importancia del pH como factor clave en la eficiencia de la bioadsorción de metales pesados.

Pérez-Cordero et al. (2015) en el municipio de Montería - Córdoba, Colombia. Identificaron bacterias endófitas tolerantes al plomo extraídas de plantas de arroz, con el fin de analizar su resistencia a diversas concentraciones de Pb(II). Tras desinfectar raíces, macollas y hojas, se realizaron aislamientos en agar R2A y se cultivaron bacterias en medio mínimo con concentraciones crecientes de Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: 0,001 mg/mL; 0,0025 mg/mL; 0,0050 mg/mL; 0,0075 mg/mL y 0,01 mg/ mL. El crecimiento bacteriano se evaluó mediante turbidimetría a 600 nm después de incubar a 32°C con agitación continua durante 5 días. Se identificaron dos morfotipos, M1TFM y M2TF733, con absorbancias de 0,0005 y 0,0136 respectivamente. La identificación final de las cepas se realizó con el KIT API20E, confirmando que correspondían a *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas putida*.

Syed y Chinthala (2015) aislaron en la India especies del género *Bacillus* de salinas solares examinados por su capacidad de desintoxicar metales pesados como plomo, cromo y cobre mediante biosorción. Aislaron 14 cepas que fueron identificadas bioquímicamente basándose en el manual bacteriológico sistema de Bergey y caracterizaron molecularmente el gen 16S rDNA amplificado mediante PCR donde se identificó a *Bacillus licheniforme* 99,0%, *Bacillus cereus* 99% y *Bacillus subtilis* con un 99% de identidad. El potencial de biosorción se dispuso a través de espectroscopia de absorción atómica, espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente y espectroscopia de dispersión de energía., según ello el plomo fue el metal más absorbido por *B. cereus* en un 89%, *B. licheniforme* y *B. subtilis* redujo la concentración inicial a un 80 y 88 %, los demás metales tuvieron una mínima adsorción. En conclusión, se indica que los agentes bacterianos son un punto crucial para afrontar problemas de contaminación de metales siendo eficiente y ecológico.

Qiao et al. (2019) en China evaluaron a *Bacillus subtilis* para desarrollar un material adsorbente que capture y elimine plomo en solución. Se muestrearon cepas en una mina de

plomo en Nanjing, cultivaron diluciones en medio Luria-Bertani con 400 mg/L de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , e incubaron a 37°C durante 48 horas. Se aislaron 7 cepas, confirmando molecularmente la presencia de *Bacillus*. Se produjo biomasa bacteriana (0,08 g) que se suspendió en soluciones con concentraciones de  $\text{Pb}^{2+}$  que iban de 200 a 1400 mg/L. La adsorción se evaluó a 25°C durante 30 minutos con agitación. La espectrometría de absorción atómica mostró que la cepa *Bacillus subtilis* X3 tuvo una capacidad de adsorción de 192,05 mg/g y toleró hasta 2000 mg/L de plomo. Los iones de plomo se adsorbieron principalmente en la superficie de las células, uniéndose a grupos funcionales como hidroxilo, carbonilo, amina y ácido fosfórico, además de enlaces  $\text{C}\equiv\text{C}$ .

Govin et al. (2020) en Cuba, se centraron en la caracterización de bacterias resistentes a metales pesados aisladas de escombros lateríticos de una minera en Moa. Cultivaron las bacterias en medio LB y obtuvieron dos aislados identificados como *Bacillus* sp. mediante el Manual de Bergey y API 50 CHB, usando pruebas bioquímicas como reducción de nitratos, citocromo oxidasa, gelatina, catalasa y asimilación de azúcares. Evaluaron la resistencia de estos aislados a níquel (Ni), cobalto (Co), cromo (Cr) y aluminio (Al) en medio Tris-MMT sólido y líquido. Ambas cepas mostraron alta tolerancia a estos metales. La cepa *Bacillus* sp. EL-1 resistió hasta 25 mmol/L de Ni; 3 mmol/L de Co; 0,5 mmol/L de Cr y 1 mmol/L de Al, mientras que *Bacillus* sp. EL-2 resistió hasta 25 mmol/L de Ni; 3,5 mmol/L de Co; 1 mmol/L de Cr y 2 mmol/L de Al. La resistencia a los metales se ordenó como  $\text{Ni (II)} > \text{Co (II)} > \text{Al (III)} > \text{Cr (VI)}$ .

Pérez et al. (2020) investigaron en Cuba la biosorción de zinc (Zn) y cadmio (Cd) utilizando cepas de *Proteus mirabilis* y *Bacillus subtilis*, analizando factores como edad del cultivo, densidad celular, pH, tiempo de contacto y tratamientos previos de la biomasa. Las cepas, obtenidas del banco de cultivos de la Universidad de la Habana, se cultivaron en caldo nutritivo, y las biomásas, a una concentración de 2 g/L, se suspendieron en soluciones de Zn y

Cd. La remoción de los metales se midió mediante espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados mostraron que *Proteus mirabilis* removió 16,42 mg/g de iones metálicos, mientras que *Bacillus subtilis* logró una remoción de 22,36 mg/g. Los autores concluyen que *Bacillus subtilis*, a una concentración de 2 g/L, es suficiente para una remoción completa, destacando la importancia de un pH neutro y un proceso rápido de biosorción, que alcanza el equilibrio en 6 horas.

Ortiz (2023) realizó un estudio en México para identificar cepas bacterianas tolerantes a plomo (Pb), arsénico (As) y cadmio (Cd). Las cepas, aisladas de suelos contaminados en Concepción del Oro, Zacatecas, mostraron tolerancia a concentraciones de hasta 135 mg/L de Pb, 30 mg/L de Cd y 60,000 mg/L de As. Las cepas se evaluaron en soluciones con concentraciones de 55 mg/L de Pb, 20 mg/L de Cd y 1000 mg/L de As, y se midió su crecimiento y capacidad de remoción de metales. Los resultados indicaron un mejor crecimiento en presencia de Pb y Cd. Las cepas fueron identificadas como *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*, destacando la cepa C23 (*B. cereus*) por su mayor capacidad de remoción de Pb y Cd. El estudio concluye que la contaminación ambiental en México fomenta el desarrollo de mecanismos de tolerancia en los microorganismos.

### **1.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES**

Mena y Rafael (2017) En Cajamarca, aislaron microorganismos que muestran resistencia a cobre (Cu), plomo (Pb) y zinc (Zn) de pasivos mineros y del agua del río Hualgayoc, con el objetivo de evaluar su potencial para la biorremediación. Para este estudio, emplearon 20 muestras enriquecidas en caldo infusión de cerebro-corazón (BHI) con diluciones de metales pesados, incubándolas a 125 rpm durante 4 días. Las bacterias tolerantes a metales se aislaron y se determinó su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Se produjo biomasa masiva y se evaluó la remoción de metales en agua bidestilada con una concentración

inicial de 10 mg/L por metal, agitada a 125 rpm por 24 horas. La concentración de metales residuales se midió por espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados mostraron que las cepas toleran hasta 250 mg/L de Cu, 200 mg/L de Pb y 150 mg/L de Zn. La biorremediación eliminó el 89% de Pb, el 80% de Cu y el 49% de Zn. Las cepas más eficientes fueron *Corynebacterium* sp., con una eficiencia de remoción del 88,8% para Pb; *Pseudomonas* sp., con 79,9% para Cu; y *Bacillus* sp., con 49,3% para Zn.

De los Ríos Silva (2021) evaluó la biorremediación de cadmio en suelos agrícolas dedicados al cultivo de cacao en Tingo María, Huánuco, Perú. Se tomaron 10 muestras de suelo, seleccionando 4 que superaban los límites de cadmio establecidos por la Unión Europea. Se aislaron e identificaron 114 cepas de *Bacillus* y 3 de *Streptomyces*. Se realizaron dos tratamientos de biorremediación (TR1 y TR2) durante 21 días. El tratamiento 1, con 10 cepas de *Bacillus*, redujo el cadmio entre un 72% y 80%, mientras que el tratamiento 2, con 2 cepas de *Streptomyces*, logró una reducción de entre 51% y 60%, demostrando la efectividad de las bacterias en la remediación de suelos contaminados por cadmio.

### **1.1.3 ANTECEDENTES LOCALES**

Dueñas y Quispe (2011) realizaron un estudio en los ríos Cañipia y Salado, ubicados en el distrito de Espinar, Cusco, con el objetivo de aislar cepas del género *Pseudomonas* y evaluar su resistencia a metales pesados. Se utilizó el método del número más probable para evaluar la calidad bacteriológica del agua y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los metales. Las cepas fueron expuestas a concentraciones de metales que variaron entre 2,5 a 3200 µg/ mL. Los resultados indicaron que la CMI más alta para el plomo fue de 3200 µg/ mL, para cadmio 100 µg/mL, mientras que para manganeso, zinc, hierro y arsénico fue de 1600 µg/ml. El cromo mostró una CMI de 800 µg/mL y el mercurio de 40 µg/mL. Estos niveles de

resistencia se atribuyen a la adaptación de las bacterias debido a la contaminación por desechos mineros y aguas servidas que afectan la calidad del agua en los ríos.

Instituto Geológico Minero y Metalúrgico- INGEMMET (2013) en el Informe de monitoreo sanitario y ambiental de la provincia de Espinar, se evaluó la presencia de metales pesados (Hg, As, Mn, Pb, Tl, Cd, Cu, Fe, Mo) en zonas aledañas a los relaves de Mina Tintaya y comunidades como Huisa y Alto Huancané. Se extrajo datos según los informes de las organizaciones de ANA, OEFA, DIGESA e INGEMMET sobre la evaluación de aguas, sedimentos y suelos. Donde para el metal plomo en el análisis de sedimentos obtuvo un valor máximo de 88,0 mg/kg para la zona Tintaya. En el informe se menciona que los metales indicados no superan las normas ambientales del país, más sin embargo en la evaluación a la población estos mismos metales se encuentran presentes en la orina, también se concluye que la presencia de metales es debido a los procesos naturales geológicos propio del medio debido a que se trata de una zona mineralizada.

Sanga (2016) evaluó la biosorción de plomo utilizando biomasa bacteriana inactiva como adsorbente. Aisló bacterias de los sedimentos de lixiviados en el botadero de Haquira, Cusco, y realizó pruebas de resistencia al plomo con soluciones de nitrato de plomo. Seleccionó cinco cepas resistentes (>93,8 mg/L), siendo la cepa BMA04 la que mostró mayor tolerancia, creciendo en concentraciones de hasta 875,82 mg/L. La cepa alcanzó su fase logarítmica de crecimiento entre las 12 y 24 horas, y entró en fase estacionaria a las 30 horas. La biosorción máxima ocurrió a un pH de 5,5 con una capacidad de adsorción de 80,64 mg/g de biomasa según la isoterma de Langmuir, indicando un proceso de quimisorción. La identificación molecular mostró que la cepa pertenecía al género *Proteus sp.*, pero la especie no había sido descrita, lo que sugiere una posible nueva especie o mutación.

Del Carpio (2017) investigó la adsorción de Pb (II) y Cd (II) usando biomasa activa de *E. coli* aislada de aguas contaminadas del río Huatanay en Cusco. Identificó siete cepas Gram

negativas, de las cuales tres fueron identificadas como *E. coli* (RHC-05, RHC-06, RHC-07). Se evaluó su resistencia a Pb (II) y Cd (II) en agar Mueller Hinton con sales, y se seleccionó la cepa RHC-06 para la producción de biomasa debido a su mayor cantidad. La bioadsorción de metales se realizó ajustando el pH y el tiempo de contacto. Se encontró que la cepa RHC-06 adsorbió un máximo del 51,20% de Cd a pH 2,0 en 60 minutos, y un 80,07% de Pb a pH 6,4 en 90 minutos. Las isotermas de adsorción mostraron que el Pb se ajusta al modelo de Freundlich (75%) y el Cd al modelo de Langmuir (96,9%) con una capacidad máxima de adsorción ( $Q_{max}$ ) de 50 mg. El estudio concluye que la eficiencia de captura de metales depende del biosorbente, la concentración del metal y factores como pH y temperatura.

Cárdenas (2021) evaluó la concentración de plomo (Pb) y cadmio (Cd) en el tejido muscular de la trucha (*Salmo trutta*) en ejemplares de trucha adulta y juveniles en los ríos Cañipia, Salado y Pichigua de la provincia de Espinar - Cusco. El muestreo se realizó de manera estratificada y la medición de plomo (Pb) y cadmio (Cd) fue determinada por el método de Espectroscopía de absorción atómica. Los resultados mostraron una concentración de plomo de 0,0579 ppm en el Río Cañipia; 0,0635 ppm en el Río Salado y 0,1133 ppm en el Río Pichigua. En cuanto a la concentración media de cadmio se encontraron valores de 0,0176 ppm en el Río Cañipia; 0,018 ppm en el Río Salado y 0,0146 ppm en el Río Pichigua. Comparados con los límites máximos permisibles (LMP) para consumo humano establecidos por SANIPES (2016) y la OMS, los límites de plomo no son superiores a los límites máximos permisibles. Sin embargo, las concentraciones de cadmio se encuentran por encima de los límites máximos permisibles (LMP).

Chullo (2021), determinó la calidad del río Cañipia, ubicado en la provincia de Espinar, cuyo uso principal es para el riego de vegetales y el abastecimiento de agua para bebida de animales. Para este estudio determinó 03 zonas de muestreo para los respectivos análisis incluyendo la determinación de metales como: plomo, arsénico y mercurio analizados mediante

espectrofotometría de absorción atómica, donde el tratamiento se evaluó por triplicado. Los resultados indicaron que la concentración máxima de plomo fue de 0,013 mg/L, en cuanto al arsénico el valor más alto fue de 0,0151 mg/L y para el mercurio presento un valor de 0,00041 mg/L. En conclusión, el autor indica que las concentraciones de arsénico y de plomo exceden los límites establecidos para la categoría 1-A1 (poblacional y recreacional), sin embargo, no superan los rangos establecidos para la categoría de riego de vegetales y bebida de animales.

## **1.2 MARCO CONCEPTUAL**

### ***1.2.1 Contaminación Ambiental***

La contaminación ambiental es la incorporación de sustancias y/o elementos nocivos de origen (físico, químico o biológico), alterando el ecosistema natural o artificial. Entre los principales factores que lo provocan se destaca la actividad humana emitiendo gases a la atmósfera y la explotación desmesurada de recursos naturales, entre otros (Gonzales et al., 2014).

### ***1.2.2 Metales Pesados***

Los metales pesados son elementos persistentes y potencialmente tóxicos para la salud humana, incluso en concentraciones bajas. Se definen como "pesados" si tienen una densidad superior a 5 g/cm. Entre los más preocupantes por sus efectos nocivos están el mercurio, arsénico, cadmio, cromo y plomo. Estos metales provienen de la corteza terrestre, pero su dispersión puede deberse tanto a fuentes naturales como a actividades humanas. Las principales fuentes antropogénicas incluyen la agricultura (por el uso de fertilizantes e insecticidas), la ganadería, la minería y la industria metalúrgica (Ramírez et al., 2023). Dentro de los metales pesados existen dos grupos:

**1.2.2.1 Oligoelementos.** Son esenciales para el desarrollo normal de ciertos organismos y se necesitan en cantidades mínimas, siendo conocidos como elementos traza. No obstante,

cuando su concentración supera un umbral específico, estos metales pueden convertirse en tóxicos. Entre ellos se incluyen el arsénico (As), boro (B), cromo (Cr), cobre (Cu), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), níquel (Ni), selenio (Se) y zinc (Zn) (Sanga, 2016).

**1.2.2.2 Metales sin función biológica conocida.** Metales cuya presencia en concentraciones determinadas resultan ser tóxicas, causando disfunciones del organismo humano o animal. Llegan a ser extremadamente tóxicos y presentan la capacidad de bioacumularse en el organismo vivo estos son: (Cd, Hg, Pb, Cu, Ni, Sb, Bi) (Sanga, 2016).

### ***1.2.3 Efecto de los metales pesados en el ambiente***

Los metales pesados se consideran persistentes, no pueden ser degradados por tratamientos biológicos o químicos, al ingresar a los ecosistemas se transforman mediante procesos biogeoquímicos y se dispersan en diferentes compuestos como material particulado, coloides o moléculas disueltas, lo cual podrían permanecer en el ambiente durante periodos de tiempo extensos y la concentración en los seres humanos aumenta proporcionalmente con la ingesta (Reyes et al.,2016). La minería es una causa principal de contaminación al ambiente debido fundamentalmente por un inadecuado manejo de los residuos conocidos como jales mineros (Covarrubias y Peña, 2017).

**1.2.3.1 Contaminación del suelo por metales pesados.** Los metales pesados se encuentran en suelos y cuerpos acuáticos como parte natural de su entorno o procedentes de actividades humanas que se contempla como la minería, fundición de metales, generación de energía y la agricultura intensiva, también se menciona que las diferentes formas químicas que se encuentran en el suelo infieren en su biodisponibilidad para los organismos vivos, interfiere las condiciones ambientales, pH, potencial redox y presencia de materia orgánica (Beltrán y Gómez, 2016).

Los residuos mineros representan un potencial tóxico para los organismos vivos y afectan a los factores ecológicos, estos metales pueden afectar cuerpos de agua superficiales o subterráneos causados por el drenaje ácido, lixiviación de residuos y contaminación de suelos cercanos. Se considera que algunos metales son esenciales para el crecimiento de la flora y fauna, más sin embargo metales como el Pb, As, Cd, Hg, Tl pueden ser tóxicos aún en concentraciones mínimas (Guzmán, 2022).

**1.2.3.2 Contaminación del agua por metales pesados.** La contaminación de cuerpos de agua por medio de residuos industriales contaminado con metales pesados como el plomo, mercurio, cadmio y entre otros causan problemas ambientales y sanitarios a gran escala, con un riesgo de neurotoxicidad, mutación y carcinogénesis tanto para la biota presente como para la población consumidora principalmente en niños, embarazadas y personas expuestas. El vertimiento de cantidades grandes de residuos sin tratar, desechos industriales y residuos agrícolas de plaguicidas y pesticidas en los ambientes acuáticos provoca que el agua limpia sea cada vez más escasa y se atente sobre la calidad del agua y por ende la salud de toda la ciudadanía, animales presentes y flora aledaña (Sanga, 2016).

#### **1.2.4 Plomo**

Es un metal pesado que está presente en la superficie terrestre y en la naturaleza de manera escasa. Este fue uno de los primeros metales que el hombre extrajo de minerales como la galena (PbS), la cerusita (PbCO<sub>3</sub>) y la anglesita (PbSO<sub>4</sub>) (Pacheco Salinas, 2019). Rara vez se encuentra en su forma metálica pura, generalmente esta unido a otros elementos formando compuestos de plomo. Su número atómico es 82 y su peso atómico es de 207,21 (Pacheco Salinas, 2019) y (EPA, 2021).

**1.2.4.1 Propiedades físicas y químicas.** El plomo es un metal color gris azulado, con una superficie brillante y altamente maleable, con una densidad relativa o gravedad específica de 11,34 g/cm<sup>3</sup> a 20°C, cristaliza en octaedros y es el menos tenaz a comparación de otros

metales pesados, la temperatura de fusión es de 327,4°C y la de ebullición es de 1725°C. El plomo puede estar presente habitualmente en el ambiente con agregados (As, S, Cu, N, P, etc.) formando compuestos como nitrato de plomo, cloruro de plomo, silicatos de plomo y entre otros (EPA, 2021).

**1.2.4.2 El plomo en el ambiente.** Los compuestos químicos del plomo, tanto orgánicos como inorgánicos, son considerados contaminantes tóxicos y peligrosos, lo que genera una preocupación significativa respecto a su ingreso en la cadena trófica alimentaria (Amones y Barja, 2019).

En las aguas superficiales, el plomo tiende a formar complejos con otras sustancias solubles, aumentando su riesgo debido a su toxicidad y capacidad de acumulación en los organismos vivos (Pacheco Salinas, 2019). Esta acumulación puede alterar la red trófica y, eventualmente, afectar a los seres humanos, provocando enfermedades graves e incluso la muerte (Acharte, 2020).

En el suelo, el plomo puede quedar retenido mediante procesos como adsorción, complejación o precipitación, lo que representa un desafío para su uso agrícola. Esta retención afecta negativamente la función del suelo como recurso para la producción de alimentos (Acharte, 2020).

Además, el plomo impacta negativamente los procesos fisiológicos en las plantas, afectando el crecimiento radicular, la nutrición mineral y el equilibrio hídrico, lo que resulta en clorosis y manchas foliares. A nivel bioquímico, el plomo interfiere con la fotosíntesis al dañar los cloroplastos, reduce la cantidad de proteínas y altera la composición lipídica. También disminuye la absorción de nutrientes y desordena el metabolismo celular (Amones y Barja, 2019).

**1.2.4.3 El plomo en la salud humana.** El plomo puede afectar diversos órganos y sistemas del organismo, funcionando como un antagonista del calcio al interactuar con

proteínas que contienen grupos sulfhidrilo, amina, fosfato y carboxilo. Un aspecto crucial es el tiempo de exposición, ya que la duración y la intensidad de la exposición al plomo influyen significativamente en sus efectos nocivos. En las mujeres embarazadas, la presencia de plomo en la sangre incrementa el riesgo de complicaciones fetales, como partos prematuros, abortos espontáneos y muertes neonatales. Para niños, jóvenes y adultos, la exposición prolongada al plomo puede causar afecciones inmediatas, como el saturnismo, que se manifiesta a través de alteraciones neurológicas como encefalopatías, problemas de balance y nervios periféricos, déficit de atención y coordinación mano-ojo reducida. Además, se observan alteraciones en el sistema renal y endocrino (World Health Organization, 2022).

**1.2.4.4 Fuentes de contaminación del plomo.** El metal está presente en sus diversas formas: Compuestos y derivados (óxidos, sulfuros y sales). Estos contaminantes pueden estar en contacto con el suelo, el aire y el agua contaminando el ambiente y teniendo repercusiones en la diversidad de flora, en la fauna y en la salud de los individuos (Pacheco Salinas, 2019).

**Minería.** Tiene un impacto ambiental significativo debido a la presencia de plomo en los residuos mineros. A menudo, los depósitos de residuos mineros, especialmente en zonas áridas, no están bien gestionados, lo que provoca la dispersión de plomo y otros compuestos tóxicos por el viento y el escurrimiento ácido. Esto no solo contamina el ambiente, sino que también representa un riesgo para la salud pública debido a la exposición prolongada a este metal peligroso (Hernández-Acosta et al., 2020).

### ***1.2.5 Biorremediación por Medio de Microorganismos***

Existen diferentes estudios que demuestran la capacidad de remoción de metales pesados en base al metabolismo y fisiología de microorganismos como son las bacterias. Los estudios evidencian que los microorganismos pueden sobrevivir, adaptarse y desarrollar su capacidad para extraer o reducir metales como el cadmio (Cd), el cobalto (Co), el zinc (Zn) y el plomo (Pb). Para la acreditación de la biorremediación como una tecnología efectiva para

eliminar contaminantes específicos es crucial evidenciar que dicha sustancia o mezcla que la contenga sea biodegradable, así como asegurar que el proceso de biorremediación no causara efectos colaterales adversos sobre el ambiente (Sanga, 2016).

**1.2.5.1 Biorremediación In Situ.** Se refiere a realizar los diferentes tratamientos en el mismo lugar de la contaminación existen dos técnicas.

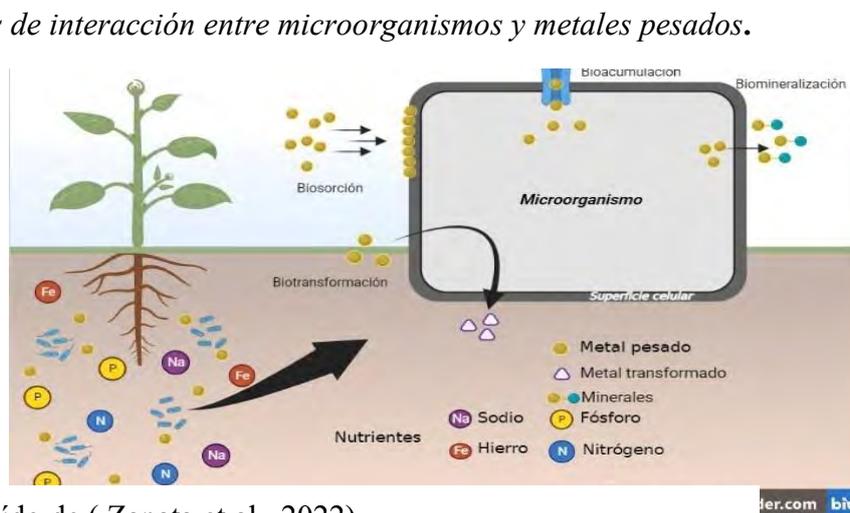
**Biomagnificación.** Agregar microorganismos naturales o genéticamente manipulados

**Bioestimulación.** Modificación del medio para potenciar el crecimiento de microorganismos (Sanga, 2016).

**1.2.5.2 Biorremediación Ex Situ.** El manejo de residuos contaminados se realiza en biorreactores controlando nutrientes, temperatura y pH. Una de las propiedades de los microorganismos resistentes a metales pesados puede usar mecanismos de movilización del metal pesado (lixiviado) e inmovilización de metales pesados la Figura 1, explica las diferentes interacciones entre el microorganismo y los metales pesados, estos incluyen: Biosorción, biomineralización, bioacumulación, biotransformación (Sanga, 2016).

**Figura 1.**

*Mecanismos de interacción entre microorganismos y metales pesados.*



Nota. Extraído de ( Zapata et al., 2022)

**1.2.5.3 Biomineralización.** En este proceso, los microorganismos pueden precipitar metales pesados en forma de carbonatos o sulfatos (Zapata et al., 2022). Este fenómeno ocurre

mediante una bomba que transporta el metal pesado del citoplasma hacia el exterior de la célula. Este transporte está facilitado por la entrada de protones ( $H^+$ ) en el interior de la célula, lo que provoca una alcalinización en la superficie externa de la célula. Como resultado, se produce la precipitación del metal pesado (Sanga, 2016).

**1.2.5.4 Biotransformación.** Es un proceso que involucra una transformación química sobre un metal, se realiza a través de un organismo bacteriano, los metales pesados tóxicos son tratados por enzimas bacterianas quienes pueden generar un compuesto poco soluble o compuestos volátiles (Sanga, 2016).

**1.2.5.5 Bioacumulación.** Es un proceso que las bacterias han desarrollado para sobrevivir a ambientes contaminados por la exposición continua a compuestos tóxicos. Este mecanismo involucra un sistema de transporte en la membrana celular que internaliza el metal pesado del entorno celular utilizando energía, a través de la  $H^+$  ATPasa. En caso del cadmio se incorpora al citoplasma de la célula donde es capturado por péptidos que forman complejos estables con el metal, neutralizando su toxicidad (Canchignia et al., 2021).

**1.2.5.6 Adsorción.** La bioadsorción es una técnica que comenzó a inicios de los años 90 con la finalidad de eliminar sustancias contaminantes provenientes del sector industrial, enfocándose principalmente en el uso de biomasa viva y muerta. Este proceso involucra la adsorción de moléculas e iones en la superficie celular lo cual puede suceder a través de intercambio iónico o atracción electrostática (Tejada et al., 2015). La eficiencia de la captura depende en gran medida por la composición química de la capa más externa de la célula. La adsorción se produce por la unión no específica de iones a grupos funcionales de polisacáridos y proteínas superficiales de la célula, los sitios de unión se van estableciendo en función a la afinidad del metal comenzado por los sitios más activos (Bautista, 2008).

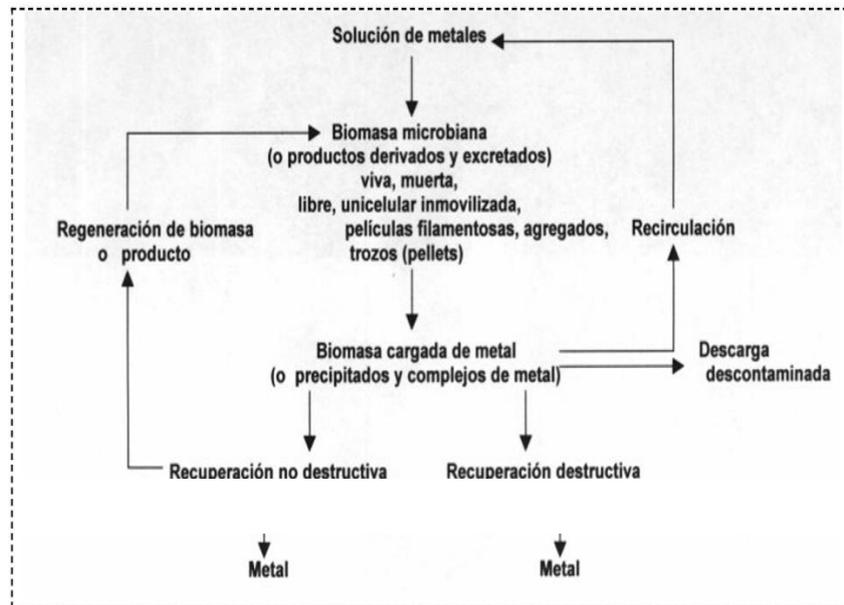
En el proceso implica la interacción entre una fase sólida (biomasa) y una fase líquida por lo general agua que contiene la sustancia de importancia para ser adsorbido (iones metálicos), para que sea un proceso eficaz es propicio una alta afinidad entre los grupos funcionales de la biomasa y el contaminante donde este último debe ser atraído hacia el sólido y unido por diversos mecanismos (Tejada et al.,2015).

La biomasa propia de los microorganismos puede ser utilizada en su forma natural o modificada por tratamientos alcalinos, esto con la finalidad de aumentar la capacidad de biosorción. Por ejemplo, la biomasa del género *Bacillus* sp. propio de los desechos en las fermentaciones industriales, se maneja con álcali seguido de ello se peletiza o se muele y finalmente se seca, al tener esta preparación se logra remover metales como Cd, Hg, Ni, Pb, U, Zn, Cr, Cu en un nivel muy amplio (Cañizares, 2000).

Una vez realizada el proceso de adsorción se puede optar por recuperar o desorber la biomasa completa empleando reactivos químicos ligeros para retirar los metales sin destruir la biomasa manteniéndolo integro, permitiendo el uso de la biomasa en un nuevo tratamiento de adsorción, en caso de que el interés sea recuperar el metal tratándose de algún metal precioso, el metal puede ser retirado por métodos drásticos como incineración o exposición a ácido/base fuerte tal como se expresa en la Figura 2 (Cañizares, 2000).

## Figura 2.

*Principios de eliminación o recuperación de metales en soluciones acuosas mediante biomasa microbiana*



Nota. Extraído de (Cañizares, 2000)

**1.2.5.6.1 Adsorción mediante *Bacillus* sp.** Proceso físico - químico donde se adsorben los iones metálicos en la superficie de la célula. Se lleva a cabo por una afinidad de los iones metálicos a la pared celular pueden actuar diversos mecanismos como el intercambio de iones, precipitación o atracción electrostática, este proceso es idóneo utilizando materiales biológicos ya sea vivo o muerto. En este proceso se contiene una fase sólida que es la biomasa y la fase líquida generalmente agua donde están disueltos los iones metálicos, se logra con éxito siempre y cuando exista una alta conexión del contaminante con los grupos funcionales de parte de la biomasa, debido a que el contaminante necesita ser atraído hacia el sólido y unirse por diversos mecanismos (Tejada et al, 2015).

La adsorción ocurre debido a la una unión no específica de los iones con los grupos funcionales de los polisacáridos y las proteínas de la superficie celular o metabolitos que son secretados. La captura se debe a la composición química de la capa celular más externa, la

deposición del metal se presume que ocurre en las zonas de grupos de las cabezas polares de los constituyentes de la membrana o bien en las capas de peptidoglicano (Bautista, 2008).

Existen tres clases de adsorción según la afinidad entre el soluto y el adsorbente (Tejada et al., 2015):

1. **Tipo eléctrico:** Mediante una atracción electrostática donde existe el intercambio de iones mediante la presencia iónica de la sustancia en interés sobre la superficie del adsorbente.
2. **Fuerzas de Van der Waals:** Esta interacción se conoce también como fisisorción, en este proceso las moléculas adsorbidas están unidas a la superficie débilmente.
3. **Tipo químico:** Se denomina de esta forma cuando el adsorbato genera enlaces fuertes con los sitios activos del adsorbente, en este caso el adsorbato padece una transformación.

**Variables en la adsorción.** Existen condiciones como la temperatura, el pH, el tamaño de partícula y presencia de iones que pueden afectar en adsorción (Tur-Naranjo et al., 2012) y (Tejada et al, 2015).

1. **Variable temperatura:** Un incremento considerable de la temperatura provoca alteraciones en la estructura del adsorbente y degradación del material, lo que resulta en una disminución de la capacidad de adsorción.
2. **Variable pH:** Es crucial la regulación del pH debido a que los iones del hidrogeno actúan como competidores fuertes en la adsorción. La capacidad de adsorción de los iones metálicos está regida por las propiedades de la superficie del adsorbente y su distribución en la solución acuosa. La variable pH en el medio acuoso es un punto crucial, por ejemplo, para la adsorción de cationes es favorable a un pH

superior de 4,5 por el otro lado para una adsorción óptima en los aniones se establece un pH de 1,5. El pH óptimo para una buena adsorción del género *Bacillus* es a un pH de 4,2.

3. **Variable tamaño de partícula:** Se indica que la adsorción ocurre en los poros de la pared celular en sitios precisos, es entonces que la concentración de soluto adsorbida es directamente proporcional al volumen, este se encuentra relacionado directamente con el área externa. Además, se reconoce que cuando una partícula es más pequeña implica una mayor área superficial por ende resultaría un área mayor de superficie interna por la cantidad de poros por unidad de masa.

4. **Variable presencia de iones:** La existencia de iones en la solución implica que pueda existir una competencia con el metal por los lugares de adsorción.

#### ***1.2.5.6.2 Determinación de la capacidad y eficiencia (%) de adsorción para***

##### ***Bacillus sp.***

#### **Capacidad de adsorción**

Una característica crucial de un adsorbente, es su capacidad para retener el adsorbato la cual depende directamente de la superficie específica del material, el volumen y el tamaño de los poros, Garcés y Coavas (2012). Este parámetro es fundamental ya que, al mejorar la capacidad de adsorción, puede ser utilizado en procesos de remoción de metales pesados o en la recuperación de iones metálicos en la solución, también se indica que una máxima capacidad de adsorción ocurre cuando la biomasa es inactiva, permitiendo un mejor acceso además de tener un bajo costo (Tejada et al, 2015).

La capacidad de adsorción puede ser calculada por la siguiente ecuación matemática: (Sanga, 2016) y (Díaz Rodríguez et al., 2021).

$$q(\text{mg/g}) = \frac{(C_i - C_f) * V}{m}$$

Donde:

$q(\text{mg/g})$ : Capacidad de adsorción (mg/g)

$C_i$ : Concentración inicial de plomo (II) en las disoluciones (mg/L)

$C_f$ : Concentración final de plomo (II) en las disoluciones (mg/L)

$V$ : Volumen de la disolución (L)

$m$ : Peso de la biomasa seca de la cepa bacteriana (g)

### **Eficiencia de adsorción**

La eficiencia se define como la proporción entre la concentración metálica eliminada y la concentración metálica del remanente, la determinación de este parámetro es fundamental para corroborar el buen funcionamiento de un sistema de adsorción. Usualmente se expresa en forma de porcentaje y se puede calcular mediante la siguiente formula: (Humanante, et al, 2022).

$$\text{Eficiencia de adsorción}(\%) = \frac{(C_i - C_f) * 100}{C_i}$$

Donde:

$C_i$ : Concentración inicial del metal en la solución

$C_f$ : Concentración final del metal en la solución

#### **1.2.6 Resistencia Bacteriana a Metales Pesados**

Las bacterias desarrollaron diferentes mecanismos genéticos de resistencia bacteriana para tolerar condiciones adversas como altas concentraciones de los metales pesados, esta característica hoy en día es una de las opciones más prometedoras para el diseño de estrategias aplicables al área de la biorremediación de ambientes contaminados (Sanga, 2016).

**1.2.6.1 Mecanismos Bacterianos para la Resistencia a Metales pesados.** Existen diferentes mecanismos bacterianos para la tolerancia frente a los efectos de los metales pesados

tales como: (captura de iones por la célula bacteriana, transformaciones mediadas, expulsión de iones metálicos) (Sanga, 2016).

### ***1.2.7 Determinantes Genéticos de Resistencia***

Los genes que codifican proteínas involucrados en la resistencia bacteriana a metales pesados suelen residir en el cromosoma bacteriano o en elementos móviles como plásmidos o transposones. Estos genes plasmídicos que confieren resistencia bacteriana a altas concentraciones de metales pesados pueden transferirse de una célula a otra a través de la transmisión horizontal de material genético facilitando la adaptación a corto plazo de la comunidad microbiana, muestran una gran especificidad, y son similares a otros productos codificados por genes que intervienen en el metabolismo celular, además que actúan como sistemas inducibles en la mayoría de casos (Sanga, 2016).

### ***1.2.8 Biodisponibilidad***

La biodisponibilidad se refiere a la cantidad de metales pesados en sedimentos o suelos que los organismos vivos pueden absorber y procesar. Este proceso depende del tipo de organismo, la forma en que el metal está disponible, y las características del suelo, como su pH y textura, así como el tiempo de exposición y acumulación en el organismo. La biodisponibilidad implica varios pasos: absorción del metal, su distribución a través del organismo, su metabolismo y finalmente su eliminación (Rendina, 2015). Este concepto es esencial para evaluar los riesgos potenciales de los contaminantes en el ambiente y es crucial para la remediación. La biodisponibilidad permite estimar qué fracciones de los contaminantes están disponibles para los organismos en diferentes plazos: corto, medio o largo (Lago, 2018).

## **1.2.9 *Bacillus* como material adsorbente**

### **1.2.9.1 Ubicación taxonómica**

Dominio: Bacteria

Filo: *Firmicute*

Clase: *Bacilos*

Orden: *Bacillales*

Familia: *Bacilliaceae*

Género: *Bacillus*

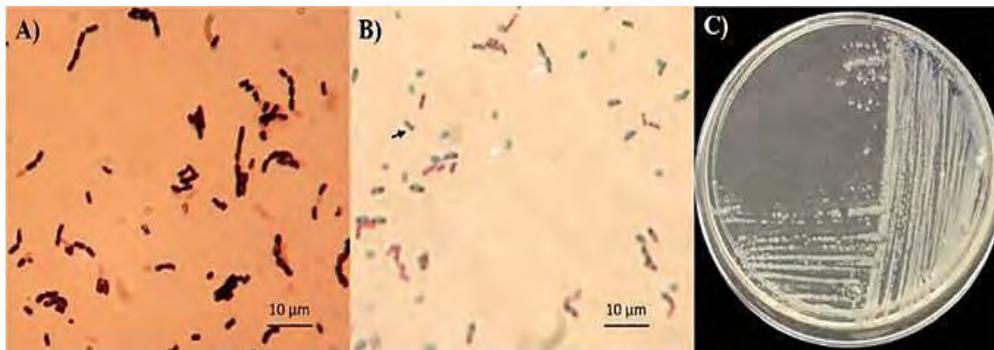
Especie: *Bacillus* sp.

Fuente: (Villarreal et al., 2018)

**1.2.9.2 Características.** El género *Bacillus* fue reportado inicialmente por Cohn en 1872 como bacterias con capacidad de producir endosporas que resisten a altas temperaturas. En la actualidad, el género incluye más de 336 especies que, debido a su similitud genética, pueden agruparse en diferentes categorías, nombrando los más destacados *Bacillus* patógenos como *B.cereus*, *B.anthraxis* y *B.thuringiensis*; *Bacillus* ambientales como *B.subtilis*, etc. Son bacterias Gram positivas, que producen endosporas (Figura 3), que le brinda la capacidad de resistir a las temperaturas como también resistencia a factores físicos extremos como la desecación, radiación, a la presencia de ácidos y desinfectantes químicos. En su crecimiento presenta un rango de temperaturas extenso, sin embargo, generalmente se consideran especies mesófilas (crecen a temperaturas de 30 y 45°C) (Corrales Ramírez et al., 2017) y (Villareal et al., 2018).

### Figura 3.

*Características morfológicas de Bacillus sp. de la colección de microorganismos*



*Nota:* A: Células bacilares, Gram positivas; B: Endosporas de color turquesa; C: Morfología macroscópica de *Bacillus* (Villareal et al., 2018).

Presenta una característica principal que es la habilidad de formas endosporas (ovales o cilíndricas) esto con el objetivo de sobrevivir bajo condiciones desfavorables, también pueden mantenerse en estado vegetativo dando lugar a una esporulación, del mismo modo este género se adapta a cambios abruptos de temperatura gracias a la presencia genes en respuesta al de shock térmico como las proteínas chaperonas y las proteasas (Calvo y Zúñiga, 2010).

**1.2.9.3 Ecología del género *Bacillus*.** Se halla ampliamente distribuido en varios entornos naturales como suelos y aguas dulce El género *Bacillus* tiene la capacidad de formar esporas lo que le permite tolerar distintos ambientes, cualidad que le propicia estar presente en una amplia variedad de hábitats tanto acuáticos como terrestres. En el entorno terrestre, estas bacterias pueden interactuar de forma directa en la función de agentes rizosféricos, como también actúan de manera indirecta al producir sustancias antagonistas de patógenos donde se ha observado que algunas cepas muestran actividad biocontroladora contra patógenos vegetales o pueden inducir mecanismos de resistencia (Corrales Ramírez et al.,2017).

El suelo actúa como el principal habitat de este género ya que muchas de sus especies son saprofitas llegando a utilizar diferentes sustratos orgánicos presentes en el suelo, ya que

esta es una matriz compleja para el establecimiento de una amplia diversidad genética funcional de cepas microbianas (Villareal et al., 2018).

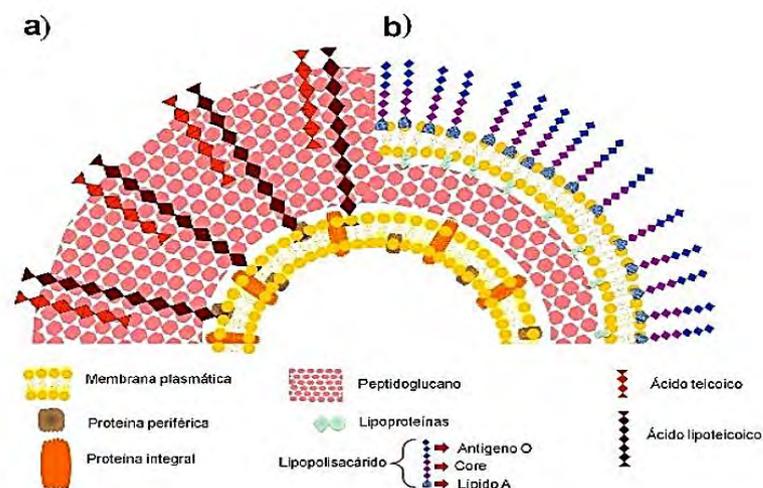
#### 1.2.9.4 Estructura

##### Pared celular

Las bacterias presentan una pared celular, la cual tiene como finalidad mantener la integridad de la célula y llevar a cabo diferentes procesos, su pared celular se asemeja a una malla según Dörr et al, (2019). En la Figura 4 se detallan los Gram positivos que contienen moléculas como peptidoglicano (alrededor de 30 a 100 nm), sobre la cual otros polímeros se unen covalentemente tales como: ácidos teicoicos, ácidos teicurónicos, lipoteicoicos, proteína periférica y proteína integral; y los Gram negativos con peptidoglicano (alrededor de 2 a 10 nm), lipopolisacáridos, lipoproteínas y proteínas periféricas e integrales (Cuervo-Parra et al., 2024).

#### Figura 4.

*Estructura bioquímica de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas*



*Nota:* a) Gram positivas, b) Gram negativas. Extraído de (Cuervo-Parra et al., 2024).

La pared celular de la célula vegetativa de la mayoría de las especies del género *Bacillus* está conformada por peptidoglicano el cual contiene ácido meso-diaminopimelico, sin

embargo, hay excepciones como *B. sphaericus*, *B. pasteurii* y *B. globisporus* que presentan lisina en lugar de ácido meso-diaminopimelico (Dussán, 2006).

En muchos casos el ácido meso-diaminopimelico está ligado directamente a la D-alanina, por lo general estas cadenas tetrapeptídicas de peptidoglucano son unidos por un puente anclador interpeptídico entre ácido meso-diaminopimelico y D-alanina. En algunos casos de *Bacillus*, el puente interpeptídico en mención que conecta la D-alanina y el ácido meso-diaminopimelico está ausente, por ejemplo, en aquellas especies que está presente la L-lisina en lugar del ácido meso-diaminopimelico, presenta sus esporas del mismo tipo de subunidades de ácido murámico en la corteza de la spora (Dussán, 2006).

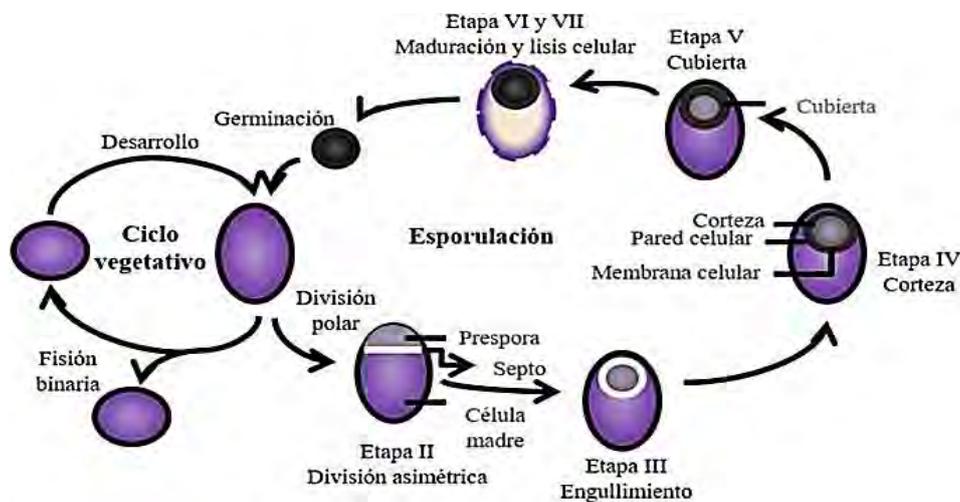
La superficie bacteriana del género *Bacillus* es muy compleja y está relacionada a propiedades de resistencia, adherencia y respuesta quimiotáctica. La estructura consiste en una cápsula, varias capas de peptidoglucano y proteínas de la superficie externa de la membrana citoplasmática, una capa superficial proteica poco conocida y cristalina denominada "S-layer" (encargada de enmascarar la carga negativa del peptidoglucano y evitar la auto aglutinación, incluso en algunas especies juega un papel importante en las interacciones metálicas Ejemplo. Uranio (Dussán, 2006).

### **Endosporas**

Es una estructura que permite a *Bacillus* y sus diferentes especies tolerar condiciones adversas de temperatura, de pH, resistencia a antibióticos y resistencia a metales pesados. Se presenta dos fases detalladas en la Figura 5, la primera fase es de crecimiento vegetativo, la bacteria se encuentra en un medio de condiciones favorables para su crecimiento y se divide por fisión binaria. En la segunda fase la bacteria se expone a factores de estrés como una alta densidad poblacional, escasez de nutrientes, salinidad, cambios en la temperatura, pH o presencia de contaminantes Por consiguiente la célula inicia la formación de endosporas, este proceso implica una división celular de forma asimétrica que resulta en la formación de dos

compartimentos donde se sitúa la célula madre y una pre-espora, finalmente la pre-espora se encuentra protegida por capas de componentes proteicos, peptidoglicano y una pared anterior formada por células germinales, a continuación, se produce la deshidratación y maduración, para lograr que la célula madre se desintegre y libere la endospora la cual permanece inactiva hasta que las condiciones del medio sean propicias para convertirse en una célula vegetativa activa (Villareal et al., 2018).

**Figura 5.**  
Ciclo de reproducción de esporas en el género *Bacillus*.



Nota. Extraído de (Villareal et al., 2018)

### 1.2.10 Identificación de *Bacillus* sp.

Para la identificación de microorganismos se opta por los criterios de diferenciación descritos en el Manual de Clasificación de Bergey donde se incluye caracteres morfológicos y fisiológicos. En la identificación de este género no basta evaluar las características fenotípicas, es por ello que se incluye al estudio la identificación molecular (Campaña, 2018).

En este tipo de análisis se incluye la forma de las colonias y células, presencia o no de endosporas, presencia de flagelos, tinción Gram entre otras (Campaña, 2018).

**1.2.10.1 Caracterización macroscópica.** Las colonias del género *Bacillus* se distinguen por su tamaño y forma variables, lo que les da un aspecto diverso en los cultivos. Generalmente,

presentan bordes ondulados y una coloración que puede variar entre blanco y amarillento. La textura de estas colonias es característica: seca y viscosa, lo que contribuye a su apariencia robusta y su capacidad para formar estructuras definidas en medios sólidos. Esta descripción macroscópica ayuda en la identificación preliminar de *Bacillus* en cultivos microbiológicos (Ñacato y Valencia, 2016).

**1.2.10.2 Caracterización microscópica.** Para su observación se hace uso de tinciones que contrastan la morfología de *Bacillus* sp.

**Tinción Gram.** En la tinción de Gram, se emplea cristal violeta, el cual se adhiere al peptidoglicano de la pared celular de las bacterias. A continuación, se aplica el mordiente (Lugol), que fija el cristal violeta formando un complejo. Posteriormente, se utiliza una mezcla de alcohol y acetona para deshidratar la pared celular y sellar los poros; las bacterias Grampositivas, con una capa gruesa de peptidoglicano, retienen el complejo colorante y permanecen azul-violeta, mientras que las Gramnegativas, con una capa más delgada, pierden el colorante. El género *Bacillus*, siendo Grampositivo, aparece azul-violeta al microscopio debido a su capa de peptidoglicano de 20 a 80 nm de espesor (González, M. et al., 2020).

**Tinción de Schaeffer Fulton.** Para identificar bacterias esporuladas del género *Clostridium* y *Bacillus*, que forman endosporas, estructuras altamente resistentes y deshidratadas. Dado que las endosporas tienen capas impermeables, se debe calentar la muestra para permitir que el colorante verde de malaquita penetre en ellas. Este colorante, al ser hidrosoluble, tiñe las esporas mientras el material celular se decolora con agua. A continuación, se aplica safranina, un colorante de contraste que da un tono rosa al citoplasma. Bajo el microscopio, un resultado positivo se observa con esporas verdes y células vegetativas coloreadas de rosa (González M. et al., 2020).

**1.2.10.3 Identificación bioquímica.** Se realizan análisis fisicoquímicos en medios de cultivo para determinar las características metabólicas de bacterias, enfocándose en la presencia de enzimas preformadas. Estas pruebas pueden ofrecer resultados en segundos o pocas horas mediante cambios en el pH o la aparición de pigmentos de colores específicos. Las pruebas realizadas incluyen TSI (Agar con azúcar triple y hierro), LIA (Agar de hierro y lisina), MIO (Movilidad, indol y ornitina), catalasa, urea, citrato y licuefacción de gelatina, siguiendo las instrucciones específicas de cada ficha técnica comercial (Apolinario, 2018).

**Tabla 1.**  
Identificación bioquímica para diferentes especies del género *Bacillus*.

Fuente	Especies	IDENTIFICACION BIOQUIMICA									
		TSI	LIA	Simmons Citrato	MIO	Urea	Gelatinasa	Catalasa			
Syed y Chintala, 2015	<i>B. cereus</i>	K/A	0	-	Indol -	-	0	+			
Corrales et al., 2011	<i>B. cereus</i>	K/A	0	+	Movilidad +	-	0	0			
Osman, 2008	<i>B. cereus</i>	K/K	LIA - LISINA -	+	Movilidad + Indol -	-	+	+			
Corrales et al., 2011	<i>B. subtilis</i>	A/A	0	-	Movilidad +	-	0	0			
Carrera, 2010	<i>B. thuringensis</i>	K/A	0	+	Ornitina - Movilidad + Indol	-	+	+			
Ortiz, 2023	<i>B. thuringensis</i>	Hidrolisis del almidon +	0	0	Movilidad +	0	0	+			
Romero et al., 2017	<i>B. thuringensis</i>	K/A	0	0	0	-	-	+			
Obando y Suárez, 2015	<i>B. thuringensis</i>	K/K	K/A	+	Ornitina - Movilidad + Indol	0	0	+			
Brown et al., 1958	<i>B. mycooides</i>	A/A	0	+	Indol - Movilidad -	0	+	+			
Corrales et al., 2011	<i>B. brevis</i>	K/A	0	d	Motilidad +	+	0	0			
Corrales et al., 2011	<i>B. megaterium</i>	A/A	0	-	Motilidad +	+	0	0			
Corrales et al., 2012	<i>B. liqueniformes</i>	K/A	0	+	Movilidad +	-	0	0			

Nota. +: Positivo; -: Negativo; d: Débilmente positivo; 0: No se realizó.

K: alcalinización, A: acidificación.

**1.2.10.4 Identificación molecular.** Para una correcta identificación molecular se hace uso de genes microbianos específicos. En el caso de las bacterias el gen ADNr 16S es común en todos los géneros, sin embargo, existen genes mucho más específicos presentes solo en ciertos géneros. La técnica de PCR permite amplificar un gen o fragmento de ADN, denominado amplicón cuya secuencia de nucleótidos actúa como “huella dactilar” para emparejar un microorganismo desconocido con el género o especie de un microorganismo conocido (Carrasco et al, 2021).

### ***1.2.11 Principios de medición para cuantificar la adsorción***

Las técnicas de primera línea para estudiar los mecanismos de captura de iones metálicos involucran a los análisis fotométricos (turbidimetría, nefelometría y espectrofotometría) (Bautista, 2008).

**1.2.11.1 Fotometría.** Este método implica la medición de la luz utilizando un fotodetector, la luz puede ser absorbida por una sustancia disuelta en una solución denominándose “absorción”, dispersada o refractada por partículas suspendidas en la solución proceso conocido como “turbidimetría” o “nefelometría” (Abbott, 2022) y (Areas, 2013).

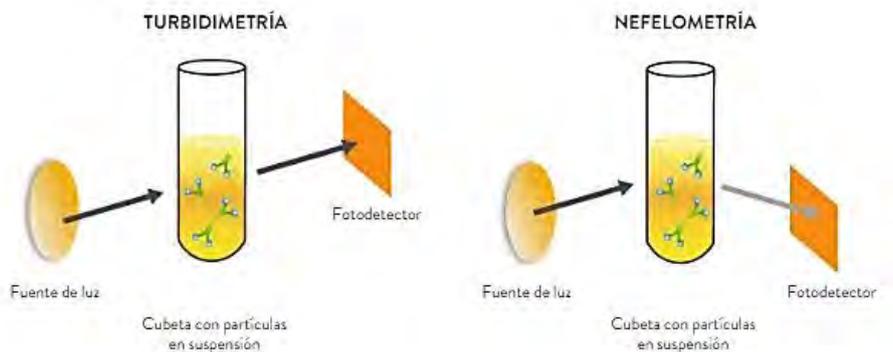
**Transmitancia.** La transmitancia (T) indica la fracción de luz que pasa a través de una muestra en relación con la intensidad de la luz original. Sirve como un indicador de la cantidad de luz que se transmite a través de la muestra (Obeso Dias, 2024).

**Absorbancia.** La absorbancia (A) mide la cantidad de luz que una muestra absorbe y es inversamente proporcional a la transmitancia (T). A mayor absorbancia, menor transmitancia, y viceversa (Obeso Dias, 2024).

**1.2.11.2 Turbidimetría.** Es la evaluación de la luz que pasa a través de una suspensión, lo que permite cuantificar el analito sin separar el producto de la solución, la dispersión es proporcional a la muestra tal como se detalla en la Figura 6. Se puede determinar mediante un espectrofotómetro de onda visible con la fuente de radiación como la lampara de wolframio, haciendo uso de un filtro para evitar que ello influya en las lecturas (Areas, 2013).

**1.2.11.3 Nefelometría.** El procedimiento descrito mide la dispersión de luz en direcciones distintas a la dirección inicial de emisión. Utilizando un nefelómetro, se determina la concentración de suspensiones más diluidas. Las partículas en una solución dispersan la luz en diferentes direcciones, generando una turbidez que indica la concentración de la suspensión. Se emplean fuentes de radiación como láser de helio-neón y lámparas de halógeno con fotoceldas ubicadas a 90°. Según la Figura 6, se recomienda usar turbidimetría para dispersión extensa y nefelometría para dispersión menor (Areas, 2013).

**Figura 6.**  
*Mecanismo de lecturas nefelométrica y turbidimetría*



*Nota.* Extraído de (Abbott, 2022)

### 1.2.11.4 Espectrofotometría

**1.2.11.4.1 Espectrometría de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente.** Es una técnica analítica que permite obtener información sobre múltiples elementos de manera rápida, precisa y exacta. Esta técnica se utiliza para identificar y cuantificar la mayoría de los elementos de la

tabla periódica en niveles de traza y ultra traza. Un proceso que combina la generación de iones mediante plasma acoplado inductivamente con un método para la separación y detección de estos iones utilizando un espectrómetro de masas, cuenta con una especial relevancia en el análisis de contaminantes en suelo (Rosero, 2017).

**1.2.11.4.2 Espectrofotometría UV-visible.** Los espectrofotómetros UV-VIS son herramientas de laboratorio empleadas para examinar tanto cualitativa como cuantitativamente distintos compuestos químicos. El principio se fundamenta en que las moléculas absorben radiación electromagnética seguido de ello se determina la cantidad de luz absorbida (Abril et al,2004).

La radiación ultravioleta visible representa una fracción reducida del espectro electromagnético, esta forma de radiación es una fusión de campos eléctricos y magnéticos que fluctúan con el tiempo y se desplazan en el espacio como ondas (Pérez y Almazán, 2015).

### **Fundamento**

#### ***Ley de Lambert y Beer.***

La longitud de luz es distinta antes y después de ser reflejada en una solución. La cantidad de luz absorbida depende del tipo de sustancia y su concentración y la distancia que recorre la luz, cuando una longitud de onda específica atraviesa un medio que absorbe luz su intensidad disminuye exponencialmente a medida que aumenta la longitud del medio absorbente (Areas, 2013).

### **1.2.12 Estándar de calidad ambiental (ECA)**

Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM, establece un estándar de calidad ambiental (ECA) que son criterios establecidos o parámetros físicos, químicos y biológicos para evaluar la calidad del aire, agua y suelo, estos criterios indican cierto nivel de riesgo para la salud humana y el estado del ambiente. Los estándares de calidad ambiental son fundamentales para el desarrollo de normativas legales y políticas públicas incluyendo programas de monitoreo ambiental y estrategias de gestión ambiental. Estos parámetros varían de acuerdo al tipo de uso del suelo a nivel nacional, específicamente para el parámetro del plomo se muestran en la Tabla 2 (Ver ANEXO N°5) (Sanga, 2016).

**Tabla 2.**

*Estándares de calidad ambiental para el plomo en agua y suelo Perú (MINAM, 2017)*

<b>Categoría</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Concentración de Pb</b>
Suelo	Suelo agrícola	70 mg/kg
	Suelo comercial/ Industrial/ Extractivos	800 mg/kg

*Nota.* En base al D.S N°011-2017-MINAM

### **1.2.13 Ubicación política del río Salado (Espinar-Cusco)**

Subcuenca del río Salado (señalado en el Mapa 1)

- Región: Cusco, Arequipa y Puno
- Provincia: Espinar, Caylloma, Melgar y Lampa
- Distrito: Alto Pichigua, Condorama, Coporaque, Espinar, Llalli, Ocoruro, Ccuviri, Pallpata, Pichigua y Tisco (Autoridad Nacional del Agua [ANA], 2013).

**1.2.13.1 Accesibilidad.** El ingreso a la provincia de Espinar, se realiza a través de la vía que conduce hacia la ciudad de Arequipa, la cual es la más concurrida y ofrece la ruta más rápida. La otra opción de acceso es por la carretera hacia la ciudad de Cusco, con menos tráfico por su carretera rudimentaria (Municipalidad Provincial de Espinar, 2022).

**1.2.13.2 Hidrología.** Las fuentes principales de agua en el distrito de Espinar provienen de lagunas, manantiales, riachuelos y ríos, sin embargo, su aprovechamiento es limitado porque muchas fuentes hidrológicas se encuentran a niveles más bajos de las tierras aptas para el riego, restringiendo su uso. Además, los caudales disponibles son mínimos por la distancia entre las fuentes de agua (Municipalidad Provincial de Espinar, 2022).

***Unidad hidrográfica Medio Bajo Salado-Alto Pichigua.*** Es una de las 9 unidades hidrográficas que se sitúa en el distrito de Alto Pichigua, se encuentra en la parte media baja de la subcuenca del río Salado, con una extensión de 248,97 km<sup>2</sup>, representando el 10,32% de la subcuenca del río Salado. El tramo principal es el río Salado es de 7,6 km, desde su unión con el río Challuta hasta su contacto con el río Cañipia (ANA, 2013).

UTM WGS84:

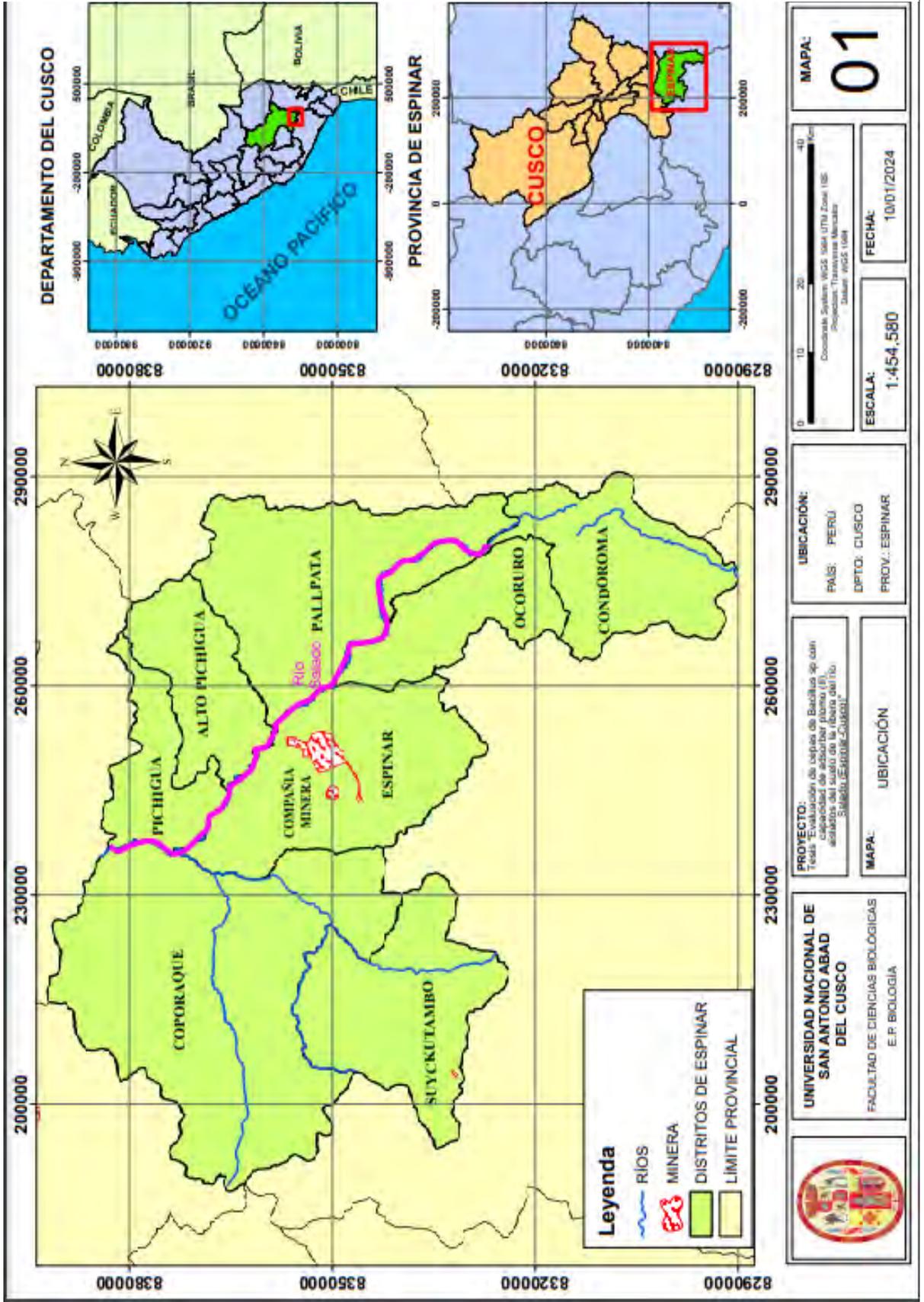
Por el este: 236495 – 205591 m

Por el norte: 8372616 – 8281929 m

Altitud: Dentro de los 3912 hasta los 5300 msnm

**Mapa 1**

*Ubicación política del río Salado en la Provincia de Espinar - Cusco*



**1.2.13.3 Actividades económicas.** En un 73% la población se dedica a las actividades agrícolas y ganaderas, implicando la producción de animales de granja, incluyendo especies mejoradas genéticamente como alpacas, ovejas, vacas y en menor medida caballos y cerdos, como también algunos hogares se dedican a la crianza de animales para su sustento o fines comerciales. En cuanto a la agricultura realizan cultivo de papa, avena forrajera para consumo de los animales y demás cultivos como cañihua, quinua y cebada (Municipalidad Provincial de Espinar, 2022).

Alto Pichigua cuenta con fuentes de recursos hídricos provenientes de ríos, lagos y manantes, brindando de esta forma gran demanda de agua, sin embargo, la actividad pesquera local presenta una economía limitada, con bajos niveles de rentabilidad debido a la falta de capacitación en la extracción, cultivo y abastecimiento. La crianza de truchas es un trabajo comunitario apoyado por la Municipalidad Distrital mediante proyectos que incluyen cosechas anuales, esto significaría a futuro una fuente de ingresos para los habitantes. La población está inmersa en la producción de fibra de alpaca, oveja y llama, así como en la elaboración de cueros y otros productos, de esta forma se organizan en asociaciones artesanales (Municipalidad Provincial de Espinar, 2022).

## **CAPITULO II: MATERIAL Y METODOLOGÍA.**

### **2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN**

Las muestras fueron tomadas en el suelo de la ribera del río Salado del distrito de Espinar, se enviaron las 02 muestras al laboratorio Certificaciones del Perú (CERPER) en la ciudad de Lima para un barrido de 25 metales. Se realizaron cultivos, aislamientos e identificación bioquímica en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. Seguidamente la identificación molecular fue realizada en el laboratorio de la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en la ciudad de Lima, luego se efectuó la prueba de tolerancia y producción de biomasa en el laboratorio de Biología Celular de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco y finalmente se determinó la capacidad y eficiencia de adsorción de plomo (II) en el laboratorio de Fractal Químicos E.I.R.L en la ciudad de Cusco.

### **2.2 ÁREA DE ESTUDIO**

Las dos muestras tomadas en la ribera del río Salado provienen del distrito Alto Pichigua, en la provincia de Espinar - Cusco, el 18 de diciembre del 2023. El río Salado es el principal afluente de la región, sin embargo, muestra signos de contaminación debido a la actividad minera situada aguas arriba. Este escenario ofrece un entorno natural idóneo para examinar la capacidad de las bacterias como *Bacillus*, en la adsorción de plomo.

### **2.3 MATERIALES**

#### ***2.3.1 Material biológico***

- Se recolectaron 2 muestras de suelo de la ribera del río Salado en Espinar-Cusco: Muestra 1 (M1) y Muestra 2 (M2), cada una con un peso total de 2 kg. De cada muestra, 1 kg se destina al análisis químico en CERPER y el otro 1 kg al laboratorio de Biotecnología - UNSAAC.

### ***2.3.2 Materiales de campo***

- GPS (Oregon 650)
- Botas
- Guantes
- Mandil
- Bolsa ziploc x 25 unidades
- Pala de muestreo
- Cámara fotográfica
- Cooler
- Rotulador
- Cuaderno de apuntes

### ***2.3.3 Materiales de laboratorio***

- Guantes de nitrilo
- Mandil blanco de laboratorio
- Mascarillas desechables
- Asa de siembra
- Piseta de plástico
- Pipeta automática 10-100ul (alemán)
- Tips Azul
- Propipeta (Lab medic)
- Algodón
- Gasa
- Membranas de nylon de 0.45 micras

- Tijeras
- Papel aluminio
- Papel craft
- Gradilla
- Alcohol de 70° y 96°
- Agua destilada
- Microespatula de acero inoxidable 150mm (Burkle-FKD503)
- Aceite de inmersión (Fagalab)
- Solución fisiológica al 0,85%

#### ***2.3.4 Material de vidrio***

- Vaso de precipitado 250 mL, 500 mL (EUROLAB-GERMANY)
- Matraz Erlenmeyer 250 mL, 300 mL(PYREX)
- Matraz Erlenmeyer 500 mL(PYREX)
- Matraz Erlenmeyer 1000 mL (PYREX)
- Matraz 250 mL (QUIMAX)
- Placas Petri (EUROLAB-GERMANY)
- Probeta 20 mL, 50 mL(EUROLAB-GERMANY)
- Pipetas de 1 mL,10 mL(EUROLAB-GERMANY)
- Tubos de ensayo 10 mL (PYREX)
- Tubos de ensayo con tapa rosca (HACH)
- Tubos cónicos con tapa rosca de 15 mL
- Láminas porta objeto (ALMACENES MEDICOS PERUANOS)
- Láminas cubre objetos (EUROLAB-GERMANY)
- Espátula de Drigalsky (Lab comercial)

- Perlas de cristal
- Varilla de vidrio (Lab comercial)
- Frascos de vidrio de 250 y 500 mL. (PYREX)

### ***2.3.5 Medios de cultivo***

- Medio de cultivo MYP (HIMEDIA)
- Medio Agar nutritivo (MERCK)
- Medio caldo nutritivo (Medlab)
- TSI (Triple Sugar Iron Agar)-(SIGMA)
- LIA (agar de hierro y lisina)-(MERCK)
- MIO (Motilidad – Indol – Ornitina)-(SIGMA)
- Urea (SIGMA)
- Citrato (SIGMA)
- Gelatinasa (DOLDER)

### ***2.3.6 Reactivos***

- Sulfato de Polimixina (SIGMA)
- Nitrato de plomo  $Pb(NO_3)_2$ ; (Fractal químicos, grado de pureza 99.80%)
- Sulfuro de amonio  $(NH_4)_2S$ ; (Fractal químicos)
- Ácido clorhídrico 0.01% HCl; (Fractal químicos)
- Peróxido de Hidrogeno (JAMPAR)
- Batería de coloración Gram (JAMPAR)

### ***2.3.7 Equipos de laboratorio***

- Microscopio (Laica)
- Autoclave (Phoenix modelo AV-75 PLUS)
- Refrigeradora (Mabe)

- Destilador de agua (Marca GFL 2004)
- Balanza analítica electrónica (JK-200)
- Estufa eléctrica (DL-1.5)
- Incubadora (J.P.)
- Incubadora de agitación (LAB COMPANION, SI-300R)
- Horno Pasteur (Mettler)
- Mechero Bunsen (ISO LAB- 050.01)
- pH metro (PR1523 HANNA INSTRUMENTS)
- TermómetroM (Checktemp HI98501)
- Espectrofotómetro (NV 203 Spectrophotometer)
- Centrífuga (GREENTMED 5702) H.W. Kessel S.A.C
- Vortex mixer (VM-300)
- Conductívimetro digital (Smartsensor)

#### **Otros**

- Emulsión de yema de huevo

## **2.4 METODOLOGÍA**

### ***2.4.1 Tipo de investigación***

La investigación fue de tipo experimental porque implica la manipulación de variables independientes como las cepas del género *Bacillus* y las concentraciones de Pb (II) en condiciones controladas de laboratorio (*in vitro*). Con un enfoque mixto porque se manejan variables cuantitativas y cualitativas.

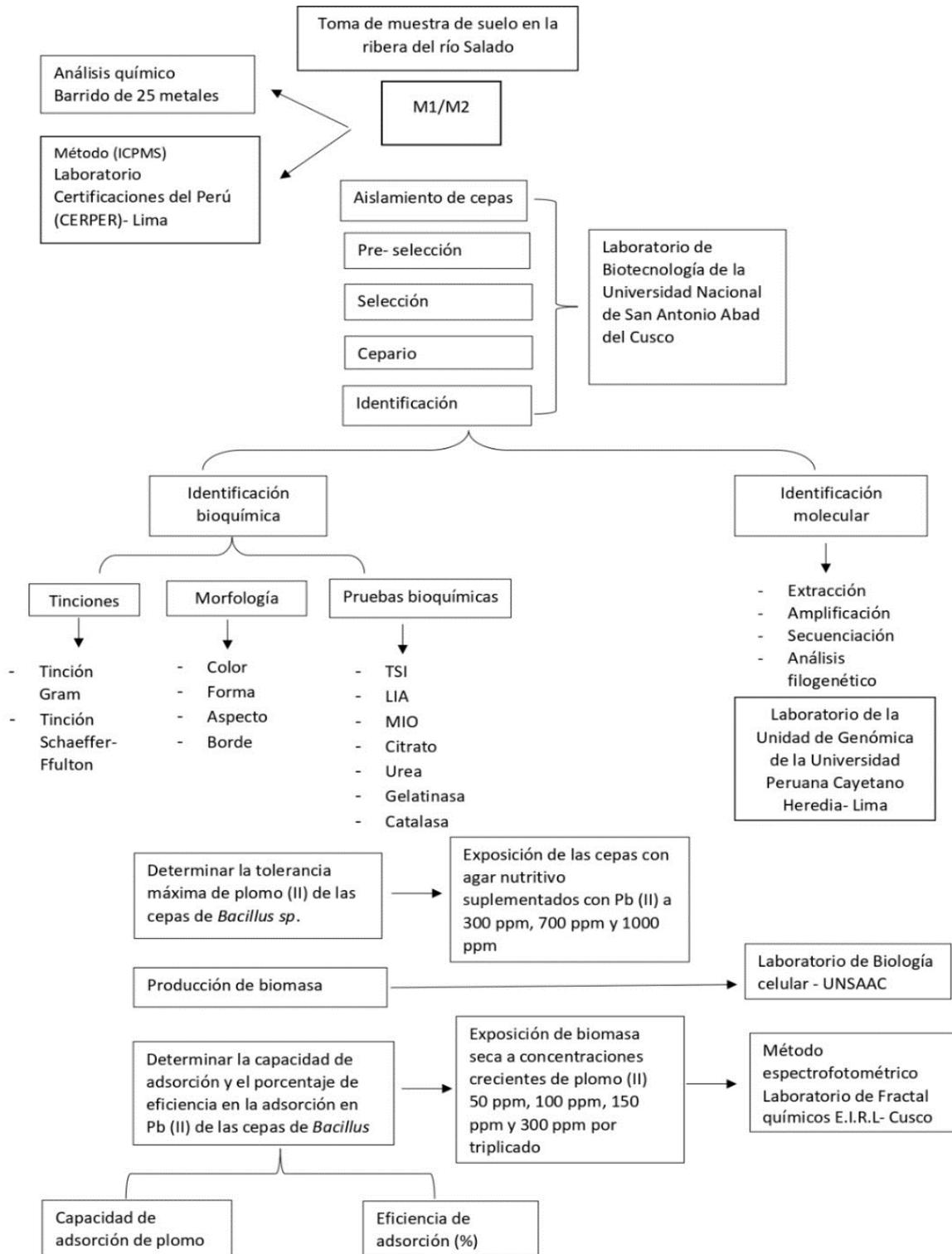
### **Línea de investigación**

Biotecnología ambiental

## 2.4.2 Flujograma de la investigación

**Figura 7.**

Flujograma de métodos para la evaluación de cepas de *Bacillus sp* con capacidad de adsorber plomo (II), aislados de la ribera del río Salado (Espinar – Cusco)



## 2.5 MÉTODOS

### 2.5.1 Determinación de la concentración de plomo en las 02 muestras de suelo tomadas de la ribera del Río Salado (Espinar-Cusco).

**2.5.1.1 Toma de muestra.** Se seleccionaron dos puntos de muestreo en función de la coloración característica observada en las aguas a lo largo de la ribera del río Salado, ya que esta coloración puede ser indicativa de la presencia de contaminantes, como metales pesados. Los puntos de muestreo (Tabla 3) fueron ubicados a la altura del distrito de Alto Pichigua, en la provincia de Espinar, específicamente en áreas cercanas al campamento minero (Mapa 2). De acuerdo a la Guía de muestreo de suelos, para suelos agrícolas, detallado en Rosales et al, (2021) y Arévalo-Hernández et al., (2016), se tomaron 02 muestras de suelo a una profundidad de 15cm, para ello se realizó una pequeña calicata en forma de V, y se obtuvo 2 kg de muestra por cada punto de muestreo con la ayuda de la pala estéril, seguidamente se colocaron en las bolsas ziploc de primer uso con cierre hermético todo ello respetando las medidas de bioseguridad.

Las muestras fueron etiquetadas con la ubicación, fecha, hora, número de muestra y nombre del muestreador. Se almacenaron en un cooler con gelpacks para asegurar un transporte adecuado. Se recolectaron dos muestras: Punto de muestreo 1 (M1) y Punto de muestreo 2 (M2), cada una con un peso total de 2 kg. De cada muestra, 1 kg se envió al análisis químico en CERPER y 1 kg al laboratorio de Biotecnología – UNSAAC.

**Tabla 3.**

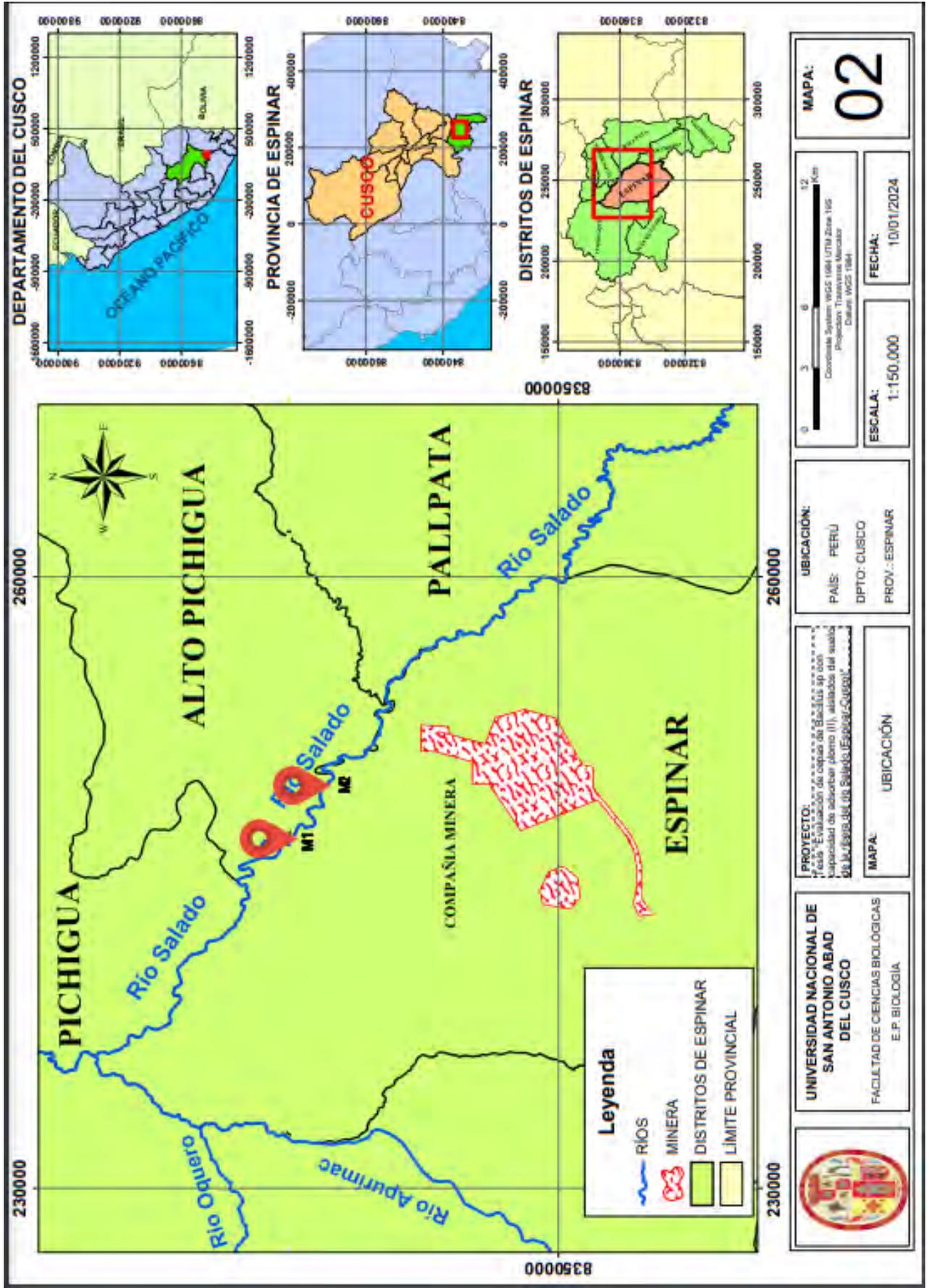
*Puntos de Muestreo ubicados en la provincia de Espinar, distrito Alto Pichigua*

Río Salado	Puntos de muestreo	Zona	Coordenadas UTM		Altitud
			Este	Norte	
	M1	19L	250284,53	8361390,9	3,899m
	M2	19L	250226,41	8361096,6	3,895m

*Nota.* M1: punto de muestreo 1; M2: punto de muestreo 2; UTM: Sistema de coordenadas universal transversal de Mercator

**Mapa 2**

*Ubicación de los 02 puntos de muestreo en la Provincia de Espinar, distrito de Alto Pichigua*



**2.5.1.2 Determinación de la concentración de plomo en muestras de suelo en la ribera del río Salado (Espinar-Cusco).** El método de Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICPMS) es muy sensible para cuantificar casi todos los elementos de la tabla periódica con potenciales de ionización por debajo del nivel del argón en unidades de nanogramos/litro o partes por billón, ppt, ppm (Riffo, 2022).

A partir de las muestras colectadas se realizó un barrido de 25 metales en el laboratorio Certificaciones del Perú (CERPER), mediante ICPMS (ver ANEXO N°2).

### ***2.5.2 Aislamiento e identificación de cepas de Bacillus sp. en base a sus características morfológicas, bioquímicas y moleculares***

**2.5.2.1 Preparación de la muestra con la técnica de diluciones seriadas.** Se emplearon 10 g de muestra que fueron diluidos en 90 mL de solución salina esterilizada: NaCl 0,85% p/v, así se obtuvo la dilución  $10^{-1}$ , se extrajo una alícuota de 1 mL y se aplicó a tubos de 9 mL con NaCl 0,85%. Se realizó este procedimiento sucesivamente hasta llegar a la dilución  $10^{-5}$  (León, 2014).

**2.5.2.2 Cultivo bacteriano con la técnica de siembra por diseminación en placa.** Se preparó el medio de cultivo selectivo Agar Manitol Yema de Huevo Polimixina (MYP 23,01g) en un volumen de 450 mL, para su posterior utilización en la siembra de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  inoculando 0,1 mL de cada dilución en las placas gelificadas de agar MYP y aplicando la siembra por diseminación empleando la espátula de Drigalsky. Las placas fueron incubadas a 36°C por 24 – 48 horas, con monitoreo de crecimiento bacteriano cada 24 horas (Gándara y Gutiérrez 2023).

**2.5.2.3 Aislamiento y purificación por la técnica de repiques en placa.** A partir de los medios de cultivo MYP con presencia de colonias, se realizaron repiques en nuevas placas gelificadas de MYP con el uso de un asa de siembra, se seleccionaron colonias representativas con el fin de aislar cepas puras por placa. Las placas fueron incubadas a 36°C por 24 – 48 horas,

con monitoreo de crecimiento bacteriano cada 24 horas. Se realizó este procedimiento sucesivamente hasta la obtención de cepas puras en el medio de cultivo MYP (Zavala, 2007).

#### **2.5.2.4 Identificación bioquímica de las cepas presuntivas del género *Bacillus* sp.**

En base a Cuervo Lozada (2010), se realizaron pruebas bioquímicas para identificar el género *Bacillus* y diferenciar las cepas del mismo, se utilizaron las siguientes pruebas las cuales vienen con instrucciones del proveedor para su elaboración.

- TSI (Agar triple azúcar hierro)
- LIA (Agar lisina hierro)
- MIO (Motilidad Indol Ornitina)
- Urea
- Citrato
- Gelatinasa
- Catalasa

#### **2.5.2.5 Identificación molecular de las cepas presuntivas del género *Bacillus* sp.**

La caracterización molecular se realizó en base a las cepas que resultaron positivas para el género *Bacillus* bioquímicamente para la confirmación de su identidad mediante las técnicas moleculares, el análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en la ciudad de Lima (Figura 8). Para lo cual se enviaron 10 ceparios y 5 placas Petri de bacterias aisladas en Agar nutritivo, placas adecuadamente rotuladas acompañados de gel pack (Ver ANEXO N°3).

**Figura 8.**

*Muestras aisladas en agar nutritivo, enviadas a la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en la ciudad de Lima para su identificación molecular*



*Extracción de ADN a partir de cultivos aislados de Bacillus sp.* Se realizó la extracción de ADN de las cepas bacterianas proporcionadas utilizando el kit comercial Quick-DNA Fungal/Bacterial Kit de la marca ZYMO RESEARCH, de acuerdo con las instrucciones del protocolo del fabricante detallados en el ANEXO N°3.

*Cuantificación y visualización de las muestras de ADN.* Se empleó un espectrofotómetro "Biofotómetro D30 de Eppendorf®" para determinar la concentración y pureza del ADN extraído de las muestras. La concentración se midió en ng/ $\mu$ L, y la pureza se evaluó mediante la relación de absorbancias 260/280, esperando que fuera mayor a 1,8. Para comprobar la calidad del ADN, se realizó una corrida de electroforesis.

*Amplificación del marcador molecular ADNr 16S mediante PCR.* Se llevó a cabo la amplificación del ADN ribosómico 16S utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa

(PCR). Para ello, se emplearon los primers universales especificados en la tabla 4 y se siguió el programa de amplificación descrito en la tabla 5.

**Tabla 4.**

*Primers universales para la amplificación de la región 16S*

Primers 16S
27F5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

*Nota:* Extraído de (Daly et al., 2000)

Los ensayos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador “Mastercycler® Pro de Eppendorf®”

**Tabla 5.**

*Programa de la amplificación molecular*

Pasos	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Pre-Desnaturalización	1	94°C	4 minutos
Desnaturalización		94°C	1 minuto
Hibridación	30	57°C	1 minuto
Elongación		72°C	1 minuto
Elongación final	1	72°C	7 minutos
Conservación	1	15°C	Indefinido

**Secuenciamiento y análisis bioinformático.** Las muestras amplificadas fueron purificadas mediante un “kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega®”, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (Ver ANEXO N°3). Una vez re suspendidas las muestras, estas fueron enviadas a Macrogen Chile, para el servicio de secuenciamiento, cada una de las muestras fueron secuenciadas en ambos sentidos, tanto

forward como reverse. Los electroferogramas y las secuencias fueron analizados mediante ClustalX para obtener secuencias consenso. La especificidad y la identificación de las secuencias se verifico mediante la comparación de secuencias disponibles en el GenBank, mediante un algoritmo de BLASTn. Finalmente, las secuencias consenso fueron utilizadas para realizar un análisis filogenético entre las muestras identificadas, para observar distancias genéticas entre ellas y otras muestras similares (obtenidas desde la base de datos del GenBank). La construcción de los dendrogramas se realizó en base a las distancias genéticas y se utilizó el programa MEGA donde fue inferido de acuerdo al método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

### ***2.5.3 Determinación de la tolerancia máxima de Bacillus sp. en diferentes concentraciones de Pb (II)***

**2.5.3.1 Preparación de Soluciones en base a la sal Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.** El reactivo que se utilizó en el presente estudio fue la sal de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, a partir de ello se determinó la concentración exacta de plomo puro, mediante la diferencia de purezas. Se preparó una solución madre para tener abasto suficiente.

$$\text{Pureza Pb (NO}_3)_2 = 99,8\%$$

$$\text{Peso molecular Pb(NO}_3)_2 = 331,209 \text{ g/mol}$$

$$\text{Peso atomico Pb} = 207,2 \text{ mg}$$

Para hallar la concentración de Pb en la sal de nitrato de plomo, se consideró el peso atómico de plomo (Pb), sobre el peso molecular del nitrato de plomo Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, multiplicado por 100 para el porcentaje de la siguiente manera:

$$X = \frac{207,2 \text{ g/mol}}{331,209 \text{ g/mol}} \times 100\%$$

$$X = 62,5586 \%$$

Para la preparación de la solución madre, se pesó 1 g del nitrato de plomo que será aforado en una fiola de 100 mL, para este procedimiento se consideró la pureza (0,9980 g); es entonces que se tiene la siguiente formula:

$$X = \frac{0,9980g \times 62,5586 \%}{100\%}$$

X= 0,6243g equivale a 624,3 mg de plomo (II), este valor puede interpretarse también como 6243 mg/L o 6243 ppm.

Para calcular las concentraciones de iones de Pb en (ppm) que se requieren para los próximos ensayos se preparó en base a la solución madre estandarizada previamente, entonces:

$$\text{Concentracion 1} \times \text{Volumen 1} = \text{Concentracion 2} \times \text{Volumen 2}$$

Donde:

C1: Concentración de solución madre (6243 mg/L o ppm)

Volumen 1 = X

C2: Concentración de plomo requerido

Volumen 2 = Volumen de la fiola 100 ml

Se determinó el volumen requerido de la solución madre para preparar las concentraciones de plomo en ppm necesarias para los ensayos, con C1, C2 y C3 destinados a pruebas de adsorción, y C4, C5 y C6 utilizados para evaluar la tolerancia.

$$C1 \text{ (para 50 ppm): } \frac{(100 \text{ mL}) \times (50 \text{ ppm})}{6243 \text{ ppm.}} = 0,80 \text{ mL de la solución madre}$$

$$C2 \text{ (para 100 ppm): } \frac{(100 \text{ mL}) \times (100 \text{ ppm})}{6243 \text{ ppm.}} = 1,60 \text{ mL de la solución madre}$$

$$C3 \text{ (para 150 ppm): } \frac{(100 \text{ mL}) \times (150 \text{ ppm})}{6243 \text{ ppm.}} = 2,40 \text{ mL de la solución madre}$$

$$C4 \text{ (para 300 ppm): } \frac{(100 \text{ mL}) \times (300 \text{ ppm})}{6243 \text{ ppm.}} = 4,80 \text{ mL de la solución madre}$$

$$C5 \text{ (para 700 ppm): } \frac{(100 \text{ mL}) \times (700 \text{ ppm})}{6243 \text{ ppm}} = 11,21 \text{ mL de la solución madre}$$

$$C6 \text{ (para 1000 ppm): } \frac{(100 \text{ mL}) \times (1000 \text{ ppm})}{6243 \text{ ppm}} = 16,01 \text{ mL de la solución madre}$$

Se extrae el volumen calculado de la solución madre y se transfiere cuidadosamente a un matraz de 100 mL. Luego, se completa el volumen hasta el menisco con agua estéril, logrando la concentración deseada de plomo en ppm.

**Tabla 6.**

*Determinación de las equivalencias en (g) de Pb a partir de nitrato de  $Pb(NO_3)_2$*

<b>Equivalencia de la sal <math>Pb(NO_3)_2</math> a <math>Pb(II)</math></b>
<b>1g de <math>Pb(NO_3)_2</math> = 0,624 g de iones de Plomo</b>

**2.5.3.2 Determinación de la tolerancia máxima de *Bacillus* sp. en diferentes concentraciones de Pb (II)** Según la metodología de Soto-Padilla, M. et al., (2016), Tur Naranjo et al., (2012), Pérez-Cordero et al., (2015) y Herrera (2014), a partir de la identificación bioquímica y molecular de cepas presuntivas del género *Bacillus*, se sometieron a una prueba de tolerancia a concentraciones diferentes de Pb(II) (300 ppm, 700 ppm y 1000 ppm) las cuales se calcularon en base a la Tabla 6.

Se sembraron cepas de *Bacillus* sp. en medio agar nutritivo enriquecido con sal de Pb(II), a concentraciones de 300 ppm, 700 ppm y 1000 ppm a una temperatura de 36°C por 24 - 48 horas, se consideró una placa de control que no contenía la sal de Pb(II).

Las lecturas para la tolerancia de las cepas de *Bacillus* sp. se evaluaron mediante el crecimiento: (+) escaso, (++) mediano, (+++) alto y (-) no crecimiento, en los medios de agar nutritivo con las diferentes concentraciones de Pb(II), de esta manera se determinó la tolerancia máxima. (Soto-Padilla et al., 2016)

#### **2.5.4 Determinación de la capacidad y la eficiencia (%) de *Bacillus* sp. en la adsorción de Pb (II)**

La producción de biomasa se realizó en el laboratorio de Biología Celular de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, y la determinación de la capacidad y la eficiencia de adsorción se llevó a cabo en el laboratorio de Fractal Químicos E.I.R.L en la ciudad de Cusco.

**2.5.4.1 Obtención de biomasa seca de cepas de *Bacillus* sp.** En base a la metodología de Tur Naranjo et al., (2012), para la producción de biomasa se realizó el cultivo de una asada de cada cepa tolerante, fue transferida en 10 mL de caldo nutritivo y se incubó a 36°C por 24 horas. Este se trasvasó en un matraz de 200 mL de capacidad con 100 mL de caldo nutritivo y fue incubada a 36°C por 48 horas. La biomasa obtenida fue sembrada en un Erlenmeyer de 2000 mL de capacidad conteniendo 1000 mL de caldo nutritivo y se incubó a 36°C por 120 horas. La incubación requirió agitación continua de 150 rpm.

- Para la recuperación de los cultivos se centrifugó en tubos cónicos de 15 mL a 4500 rpm por 10 minutos, el precipitado se lavó continuamente por 3 veces con agua destilada para eliminar iones y otros residuos del medio.
- La biomasa se secó en una estufa a 105°C por un tiempo de 8 horas y obtener un peso constante.
- Se conservó la biomasa seca en tubos con tapa rosca.

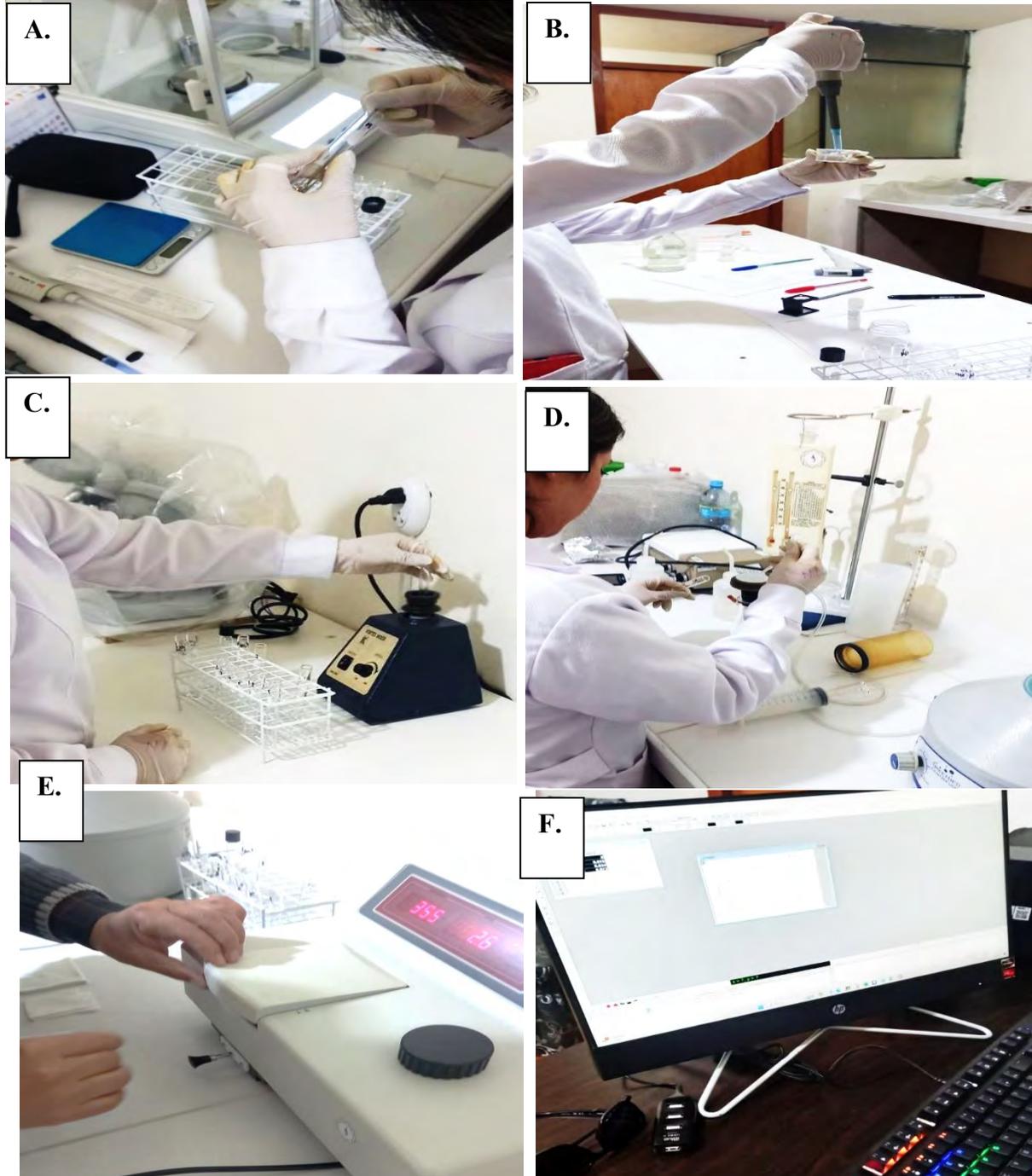
**2.5.4.2 Exposición de biomasa seca a concentraciones diferentes de Pb (II).** En base a la metodología de Tur-Naranjo, et al., (2012); Bautista (2008) y Qiao et al (2018) se siguió el orden siguiente (Figura 9):

- Se trituró y molió la biomasa con espátula de acero

- Se preparó la solución de Pb(II) a partir de la solución madre a concentraciones de 50ppm, 100ppm y 150ppm, a pH 4,2 ajustado con ácido clorhídrico HCl ( $6,31 \times 10^{-5}$  molar).
- Se hidrató la biomasa seca en 2 ml de la solución de Pb(II) por un lapso de 2 horas de exposición, en agitación continua cada 15 minutos en un vortex mixer a una temperatura ambiental (24°C).
- Se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos y se filtró con membranas de nylon de 0,45 micras, el mismo que no permitió el paso de las bacterias por la diferencia de tamaños, exclusivamente dio el paso a iones de plomo remanente.

**Figura 9.**

*Exposición de biomasa seca a concentraciones diferentes de Pb (II)*



*Nota.* A: Trituración y molienda; B: Preparación de soluciones de Pb(II); C: Hidratación de biomasa con la solución de Pb(II); D: Filtración en membranas de nylon 0,45 micras; E: Lecturas espectrofotométricas; F: Linealización de las absorbancias en la ecuación de regresión.

### 2.5.4.3 Lecturas espectrofotométricas

#### *Calibración de espectrofotómetro a 355nm de longitud*

Para determinar la exactitud fotométrica de la solución que contiene iones  $Pb^{2+}$ , se emplea sulfuro de amonio ( $(NH_4)_2S$ ), el cual interactúa con los iones  $Pb^{2+}$  presentes en la solución, formando sulfuro de plomo ( $PbS$ ). Esta solución presenta una coloración amarilla y está compuesta por partículas finas que dispersan la luz a una longitud de onda máxima de 355 nm lo que permite su cuantificación mediante espectrofotometría. El uso de este método se debe a que la espectrofotometría permite medir con alta precisión la absorbancia o dispersión de la luz a una longitud de onda en particular, lo que está directamente relacionado con la concentración de la solución presente en la muestra. Los valores de absorbancia obtenidos se utilizan para construir una recta de calibración y obtener una ecuación de regresión lineal mediante el software ORIGIN - versión 10.5.122.52971.

**Tabla 7.**

*Calibración de espectrofotómetro 355nm de longitud*

Tubo/Pb(II)	100 ppm Pb		H <sub>2</sub> O (μL)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S 485 ppm <sup>1/40</sup> (μL)	H <sub>2</sub> O(μL) Volumen final	Ab 355nm
	(μL)	(μg)				
1 0 ppm	0	0,00	950	50	1000	0,000
2 1 ppm	20	2,00	930	50	1000	0,029
3 2 ppm	40	4,00	910	50	1000	0,058
4 4 ppm	80	8,00	870	50	1000	0,122

*Nota.* Laboratorio de Fractal Químicos E.I.R.L

El sulfuro de amonio se agregó a cada tubo de muestra (50 uL) con solución remanente de plomo obteniendo una coloración amarilla. Se realizó las lecturas al espectrofotómetro a una longitud de 355nm de luz visible.

Finalmente se obtuvo absorbancias que ajustadas a la ecuación de regresión lineal

$(Y = A + B * X)$  determina la cantidad de iones de plomo no adsorbidas en la solución remanente en unidades de ppm, procedimiento que se realizó en el paquete estadístico SOFTWARE ORIGIN - versión 10.5.122.52971.

#### **2.5.4.4 Determinación de la cepa de *Bacillus* sp. con mayor capacidad y eficiencia para adsorber Pb(II)**

**Para determinar la capacidad de adsorción se usó la siguiente formula:**

$$q(mg/g) = \frac{(C_i - C_f) * V}{m}$$

Donde:

$q(mg/g)$ : Capacidad de adsorción (mg/g)

$C_i$ : Concentración inicial de plomo (II) en las disoluciones (mg/L)

$C_f$ : Concentración final de plomo (II) en las disoluciones (mg/L)

$V$ : Volumen de la disolución (L)

$m$ : Peso de la biomasa seca de la cepa bacteriana (g)

**Para determinar la eficiencia de adsorción se usó la siguiente formula**

$$\text{Eficiencia de adsorción(\%)} = \frac{(C_i - C_f) * 100}{C_i}$$

Donde:

$C_i$ : Concentración inicial de Pb(II) en la solución

$C_f$ : Concentración final de Pb(II) en la solución

#### **2.5.5 Diseño experimental**

La toma de 02 muestras en la ribera del río Salado en el distrito de Espinar, se realizó con base en la observación de la coloración de las aguas del río Salado, la evaluación de la capacidad y eficiencia del género *Bacillus* para adsorber Pb(II), consistió en exponer biomasa seca de cada cepa bacteriana a 3 concentraciones crecientes de Pb(II) 50 ppm, 100 ppm y 150

ppm, considerando 3 repeticiones por cepa (3x), bajo condiciones controladas de temperatura (24°C), pH (4,2) y un tiempo (2 horas). Considerando un control negativo (0 ppm) de Pb(II), diseño experimental detallado en la tabla 8. Datos que fueron analizados en el paquete estadístico SPSS - Versión 29.0 (Kruskal-Wallis) con la finalidad de evaluar las diferencias significativas de cada variable y Minitab-Versión 22.1.0 (ANOVA) con el objetivo de analizar la interacción de ambas variables.

**Tabla 8.**

*Diseño experimental para evaluar las cepas de Bacillus sp. con capacidad de adsorber plomo(II), aislados del suelo de la ribera del río Salado (Espinar-Cusco)*

Variable independiente				Condiciones controladas	Variable dependiente	
Cepa	Concentración Pb(II)				Capacidad	Eficiencia
	50 ppm	100 ppm	150 ppm			
CONTROL (-)	1x	1x	1x	pH 4,2 Temperatura 24°C Tiempo 2 horas		
C0001	3x	3x	3x			
C0002	3x	3x	3x			
C0003	3x	3x	3x			
C0004	3x	3x	3x			

Nota. CONTROL(-): Control negativo; 1x: Repetición única; 3x: Repetición por triplicado.

### 2.5.6 Análisis estadístico

La base de datos se manejó con el software SPSS - Versión 29.0, inicialmente se realizó la prueba de normalidad de datos con el fin de determinar si se trata de una prueba paramétrica o no paramétrica. En base a ello se optó por emplear la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el software SPSS - Versión 29.0 para evaluar la existencia de diferencias significativas (p-valor) entre 2 o más grupos de las variables independientes (Cepa y Concentración de Pb(II)) con relación a la variable dependiente (Adsorción), se complementó el análisis con la representación gráfica del diagrama de cajas para una mejor visualización de resultados. Además, se llevó a cabo un análisis de varianza bifactorial (ANOVA) en el paquete estadístico Minitab - Versión 22.1.0, para evaluar la significancia (p-valor) de las interacciones

entre las variables independientes. El valor de “*p*” es el parámetro más importante que indica la significancia estadística (si  $p < 0,05$ , existen diferencias significativas; si  $p > 0,05$  no existen diferencias significativas).

## CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Determinación de la concentración de plomo en 02 muestras de suelo tomadas de la ribera del río Salado (Espinar-Cusco)

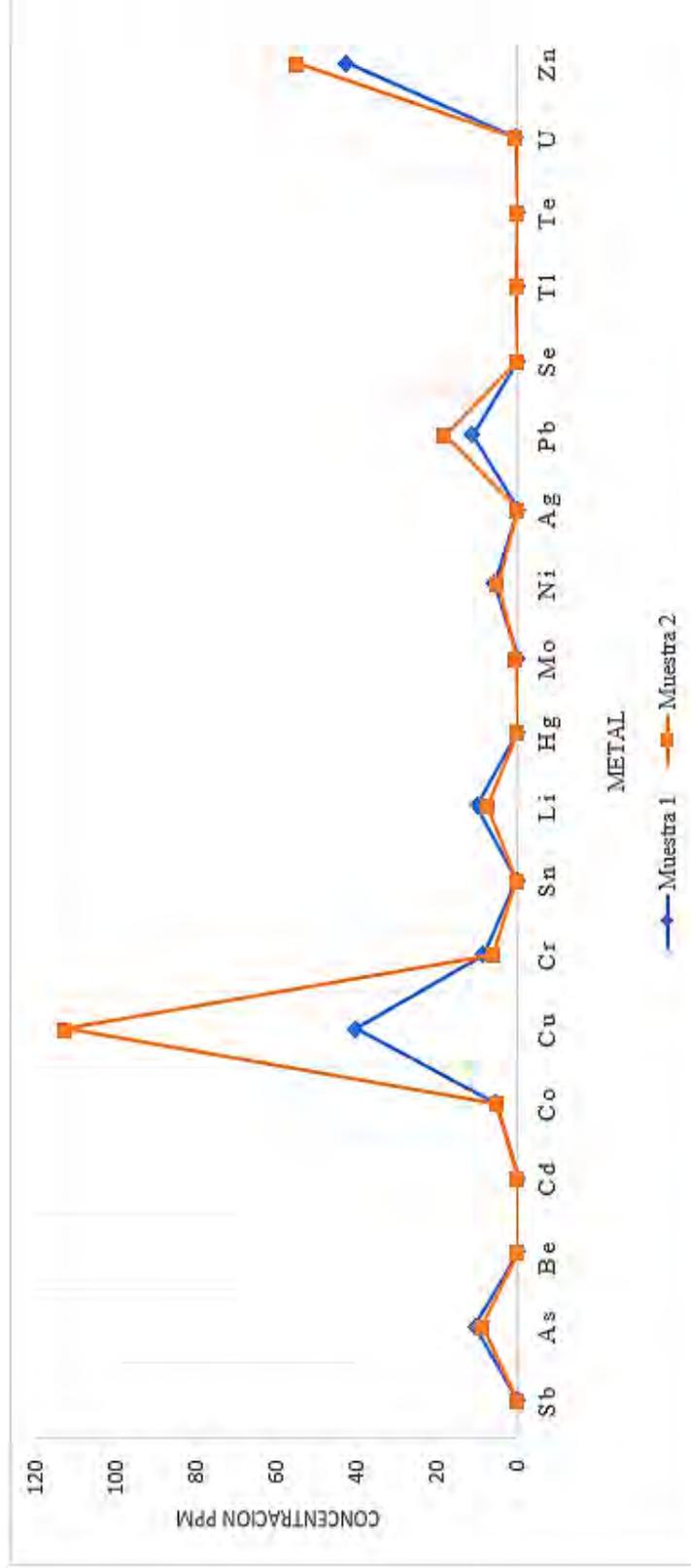
La Figura 10 presenta el análisis de metales en los dos puntos de muestreo (M1 y M2) de la ribera del río Salado en la provincia de Espinar. El gráfico ilustra la cuantificación de metales en las siguientes concentraciones: As (10,56 mg/kg en M1 y 8,78 mg/kg en M2), Cu (40,4 mg/kg en M1 y 112,6 mg/kg en M2), Cr (8,54 mg/kg en M1 y 6,06 mg/kg en M2), Li (10,2 mg/kg en M1 y 7,4 mg/kg en M2), Ni (5,82 mg/kg en M1 y 5,02 mg/kg en M2), Pb (11,31 mg/kg en M1 y 18,12 mg/kg en M2), y Zn (42,6 mg/kg en M1 y 55,3 mg/kg en M2). Las diferencias en las concentraciones entre M1 y M2 probablemente se deben a la variación en la distancia entre los puntos de muestreo y los campamentos mineros (Ver ANEXO N°2).

**Tabla 9.**

*Concentración de plomo en 02 muestras de suelo en la ribera del Rio Salado en la provincia de Espinar*

N°	[PLOMO] mg/kg o ppm	Estándares de Calidad Ambiental (ECA) suelo	
		Suelo agrícola	Suelo comercial industrial/extractivo
M1	11,31 mg/kg	70 mg/Kg	800 mg/Kg
M2	18,12 mg/kg		

**Figura 10.** Cuantificación de 25 metales en las 02 muestras de suelo obtenidas de la ribera del Rio Salado de la provincia de Espinar - Cusco, por el método de Espectrometría de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS)



*Nota.* M1: Punto de muestra 1; M2: punto de muestreo 2, Resultados en base al informe del Laboratorio

Certificaciones del Perú S.A; Se destacan 19 de los 25 metales analizados, ya que los otros 6 metales presentan concentraciones tan bajas que no son visibles en la figura.

**Tabla 10.**

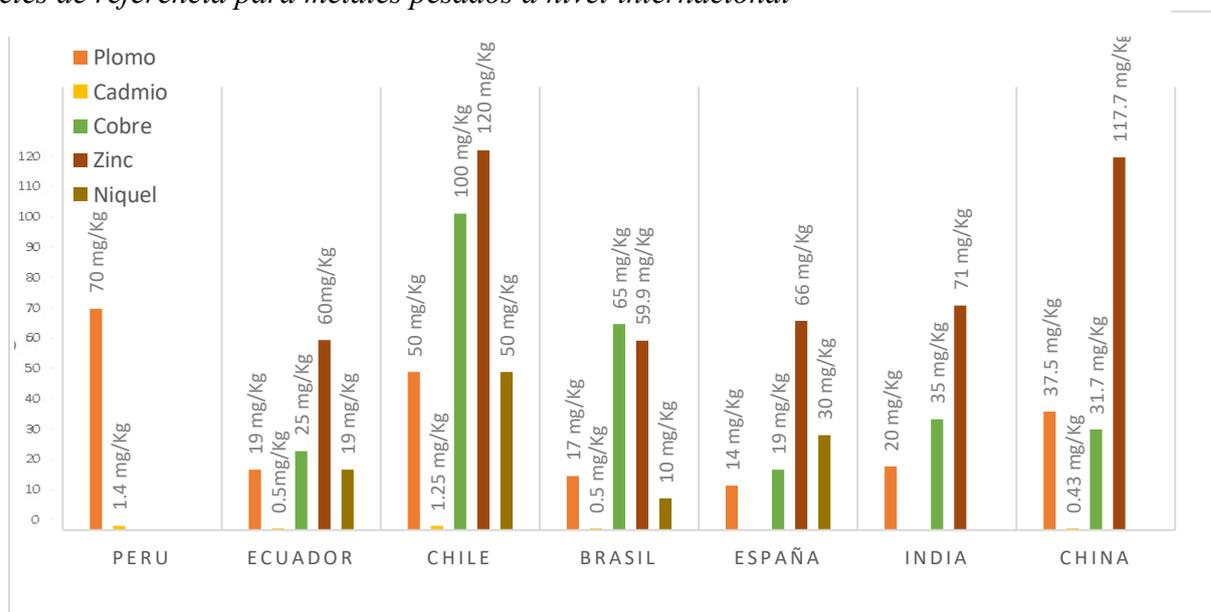
*Estándares de calidad ambiental para metales pesados a nivel internacional*

Niveles de referencia de metales pesados en el recurso suelo													
Contaminante (mg/kg)	Países latinoamericanos							Países extranjeros					
	Ecuador	México		Chile		Brasil	Perú	Murcia-España	India	EE. UU (USEPA)	China	Alemania	
		Uso agrícola	Uso industrial	Suelo con pH ≤ 6,5	Suelo con pH > 6,5								Uso agrícola
Plomo	19	400	800	50	75	17	70	800	14	20	100	37,5	1000
Cadmio	0,5	37	450	1,25	2	0,5	1,4	22	**	**	0,5	0,43	**
Cobre	25	**	**	100	150	65	**	**	19	35	25	31,7	200
Zinc	60	**	**	120	175	59,9	**	**	66	71	**	117,7	600
Níquel	19	1 600	20 000	50	112	10	**	**	30	**	50	**	200

*Nota.* pH: Potencial de hidrogeniones, \*\*: No se encontraron reportes. Camelo y Guerra (2020), Brizuela y Jiménez (2012)

**Figura 11.**

*Niveles de referencia para metales pesados a nivel internacional*



*Nota.* Tomado de Brizuela y Jiménez (2012) y Camelo y Guerra (2020)

Se determinó la concentración de plomo en 02 muestras de la ribera del río Salado (Espinar-Cusco). Hallando 11,31 mg/Kg y 18,12 mg/Kg para M1 Y M2 respectivamente (Tabla 9). Según (MINAM, 2017) el Estándar de Calidad Ambiental (ECA) de suelos refiere que el valor máximo de plomo en los suelos agrícolas debe ser de 70 mg/Kg y para suelos industriales extractivos de 800 mg/kg. En comparación con el presente estudio el Instituto Geológico Minero y Metalúrgico (2013), determinó la concentración máxima de plomo en suelos y sedimentos en la zona de Tintaya, hallando 88 mg/kg, donde se afirma lo dicho por la Figura 10, donde se hace una suposición en la toma de muestra ya que cuando es más cercana a los campamentos mineros la concentración del metal sería mayor, esto sugiere que la actividad de los campamentos mineros probablemente influye directamente en la concentración del metal en las muestras.

Tratándose de los Estándares de calidad ambiental en el Perú las concentraciones evaluadas no exceden los estándares de calidad ambiental. Sin embargo, al compararlas con los niveles internacionales para metales pesados como el plomo, se observa una discrepancia significativa. Los valores de referencia para plomo varían entre 14mg/Kg para España, 17 mg/Kg en Brasil, 19 mg/Kg en Ecuador y 20mg/Kg en India. Considerando los valores de referencia a nivel internacional las muestras evaluadas estarían superando los valores de referencia en países como España y Brasil (Tabla 10). Esto evidencia que nuestro país no le brinda la importancia necesaria a estandarizar las concentraciones de metales pesados como si lo hacen otros países (Figura 11). El riesgo de exposición prolongada a metales pesados expresa daños irreversibles en la salud humana, evidenciado en los pobladores de la provincia de Espinar quienes presentan altos niveles de plomo en su organismo (Huamani Pacaya, 2015) y (Amnistía Internacional 2021). Una situación similar también ocurre en la Oroya Junín, este 22 de marzo del 2024 mediante una sentencia de la Corte Interamericana de Derechos Humanos (Corte IDH) quienes responsabilizan al estado peruano por el incumplimiento en su deber de

regulación y fiscalización de las actividades minero–metalúrgicas por la contaminación ambiental y la afectación en la salud de más de 80 ciudadanos.

### 3.2 Aislamiento e identificación bioquímica y molecular de cepas de *Bacillus* sp.

#### 3.2.1 Cultivo para cepas de *Bacillus* sp.

Se realizó el recuento bacteriano a las 24 y 48 horas del cultivo, utilizando las muestras M1 y M2 y las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  en agar MYP. Estos recuentos se basaron en el primer cultivo de cada muestra.

#### Tabla 11.

*Conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de Bacillus sp. a las 24 y 48 horas de crecimiento en agar Manitol yema de huevo Polimixina (MYP)*

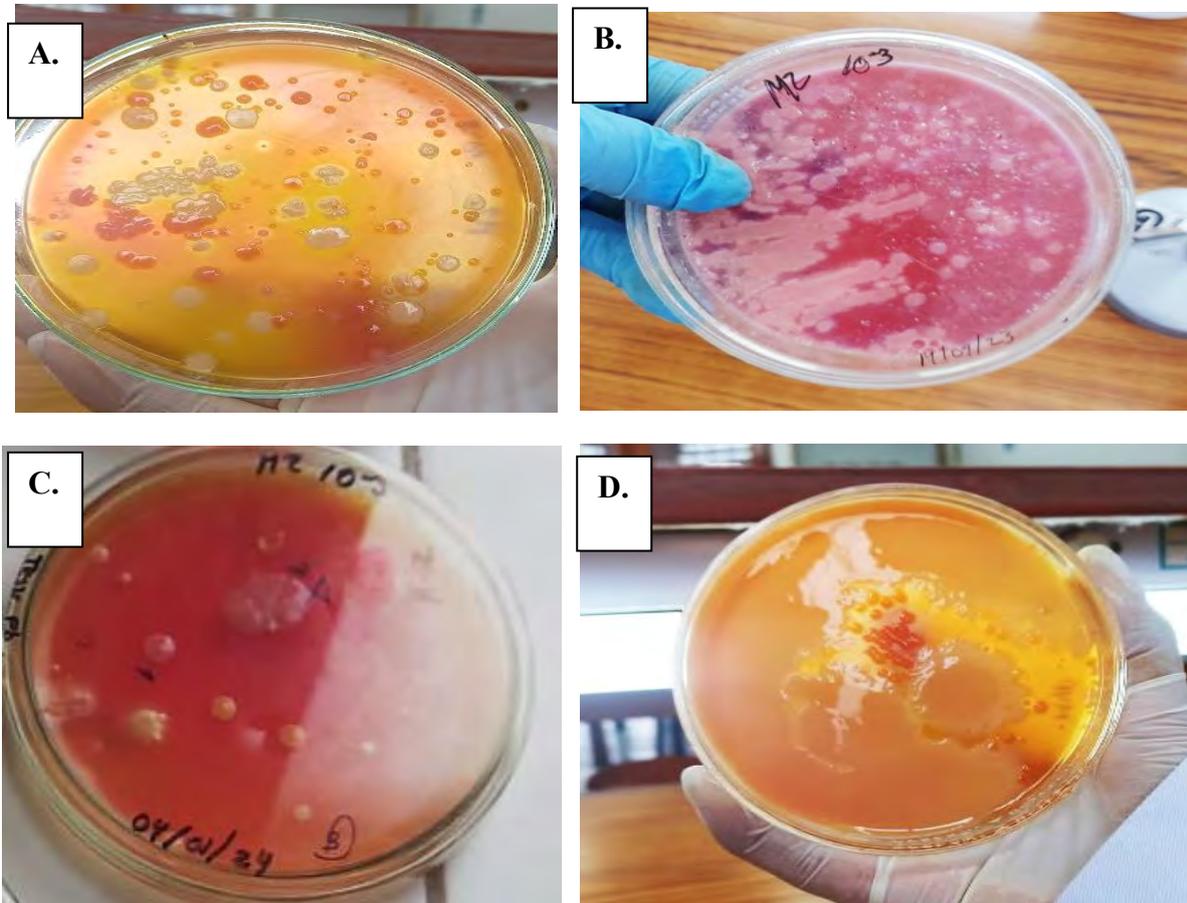
Dilución	Recuento a las 24 horas		Recuento a las 48 horas	
	M1-UFC	M2-UFC	M1-UFC	M2-UFC
$10^{-3}$	37,000 ufc/g	31,000 ufc/g	87,000 ufc/g	34,000 ufc/g
$10^{-4}$	290,000 ufc/g	160,000 ufc/g	510,000 ufc/g	260,000 ufc/g

*Nota.* M1: Muestra 1; M2: Muestra 2; UFC: Unidades formadoras de colonia.

En la Tabla 11 se presentan los resultados del recuento bacteriano en UFC de *Bacillus* sp a 24 y 48 horas de crecimiento en Agar Manitol yema de huevo Polimixina (MYP), donde podemos observar que la muestra 1 (M1) presenta mayor recuento bacteriano en UFC a comparación a la muestra 2 (M2) que presenta menor recuento bacteriano en UFC. Vargas (2017) refiere que la afectación minera provoca cambios en el recuento bacteriano, así como en su fisiología y actividad, del mismo modo Govin, et al. (2020) menciona que las bacterias expuestas a metales pesados sufren procesos de adaptación, ello permite que solo las bacterias con ciertos mecanismos especiales sobrevivan en ambientes extremos.

**Figura 12.**

*Cultivo de Bacillus sp en medio de cultivo MYP (Manitol yema de huevo polimixina) a 48 horas de incubación con una temperatura de 36°C*



*Nota.* A: Punto de muestra 1(M1), B: Punto de muestra 2(M2), C: Punto de muestra 2(M2), D: Punto de muestra 1(M1)

En la figura 12 se observan las características macroscópicas de las colonias cultivadas en agar Manitol yema de huevo polimixina (MYP), A. presenta un color naranja- amarillento con aspecto cremoso e irregular, con precipitación alrededor y bordes crenados; B presenta un color rosado tenue con bordes aserrados y aspecto cremoso; C muestra un color rosado-naranja claro sin forma definida, con aspecto cremoso y bordes lobulados; D se observa un color amarillento opaco, con presencia de bordes sin forma, aspecto cremoso y elevación de colonia

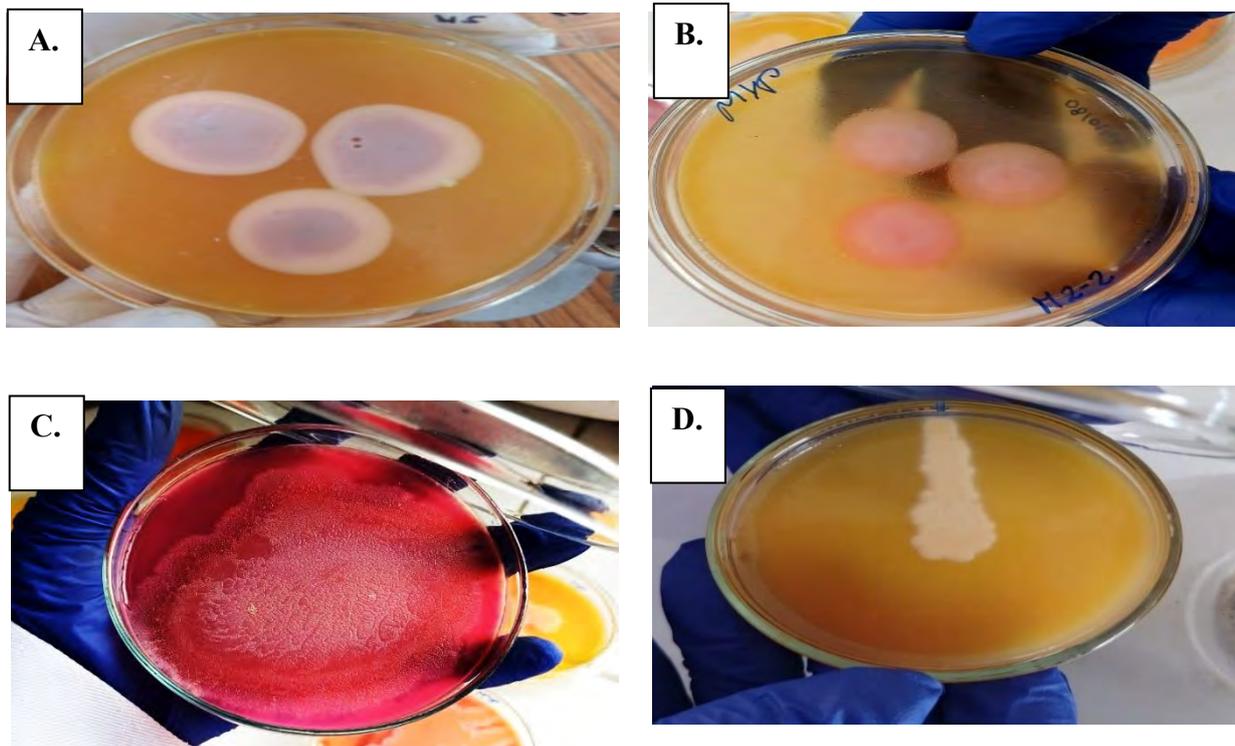
plana. Descripción que concuerda con Calvo y Zúñiga (2010), quienes mencionan las características generales como “*forma irregular, color cremoso con bordes que varían entre aserrada, lobulada, digitiforme y ondulada; las elevaciones pueden ser planas o acuminadas y la consistencia cremosa y ligosa*”.

### 3.2.2 Aislamiento de cepas de *Bacillus* sp.

Se aislaron las colonias más representativas a partir del primer cultivo en agar manitol yema de huevo polimixina (MYP) por la técnica de repique.

#### Figura 13

*Aislamiento y purificación de cepas de Bacillus sp. en agar Manitol yema de huevo Polimixina (MYP)*



Nota. A: C0001; B: C0002; C: C0005 Y D:C0012

En la figura 13 se presentan las colonias aisladas y purificadas, A: corresponde a la cepa C0001 donde se observa de color rosado claro con la formación de un halo circundante

indicando la presencia de la enzima lecitinasa, B: que corresponde a la cepa C0002 con un color rosado tenue y formación de un halo circundante indicador de la enzima lecitinasa, C: que corresponde a la cepa C0005 donde se observa un crecimiento diferente al resto, es expansivo a las 24 horas, con forma espiral y rizoideo, con una coloración blanquecina y la formación de un halo circundante y D: que corresponde a la cepa C0012 con una coloración amarillenta-naranja en este caso la presencia de lecitinasa no es tan visible.

### 3.2.3 Tinciones

Para la identificación de cepas de *Bacillus* sp. se llevaron a cabo las coloraciones de Gram y Schaeffer-Fulton. La coloración de Gram permitió distinguir las cepas Grampositivas, mientras que la coloración de Schaeffer-Fulton facilitó la identificación de las cepas esporuladas, a partir de estos análisis, se pudieron descartar las cepas Gramnegativas y aquellas que no presentaban esporas. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 12.

**Tabla 12.**

*Tinciones diferenciales: Coloración Gram y coloración Schaeffer-Ffulton*

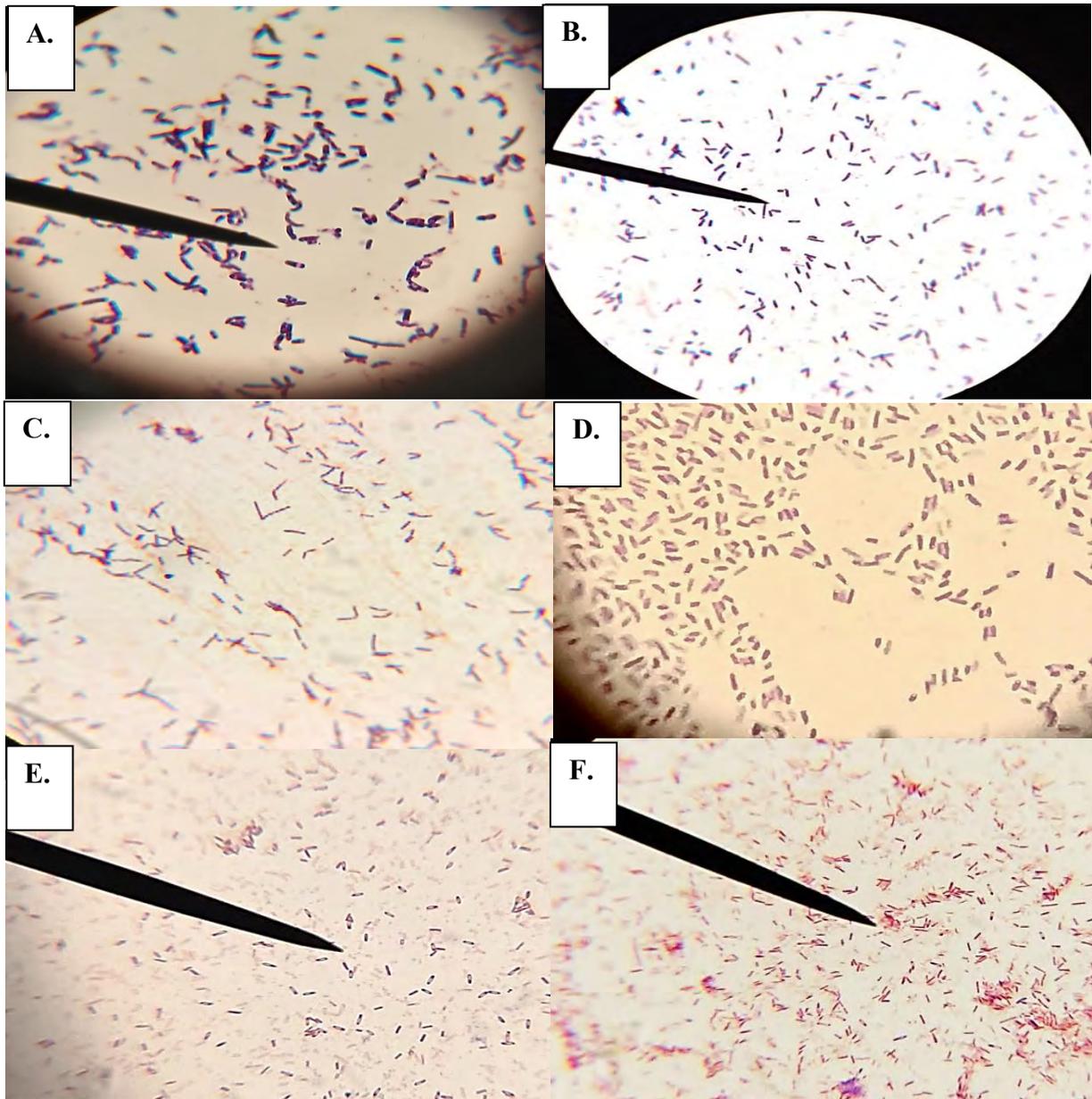
CEPA	MORFOLOGÍA	TINCIÓN GRAM	TINCIÓN Schaeffer-Ffulton
C0001	Bacilar	+	+
C0002	Bacilar	+	+
C0003	Coco	-	-
C0004	Coco bacilar	-	-
C0005	Bacilar	+	+
C0006	Bacilar	+	-
C0007	Coco bacilar	-	-
C0008	Coco bacilar	+	-
C0009	Bacilar	-	-
C0010	Bacilar	-	-
C0011	Coco bacilar	-	-
C0012	Bacilar	+	+

*Nota.* (+): Gram positivo; (-) Gram negativo; Tinción Schaeffer-Ffulton (+): Presencia de esporas; (-) ausencia de esporas

### 3.2.3.1 Coloración Gram y Shaeffer-Ffulton

**Figura 14.**

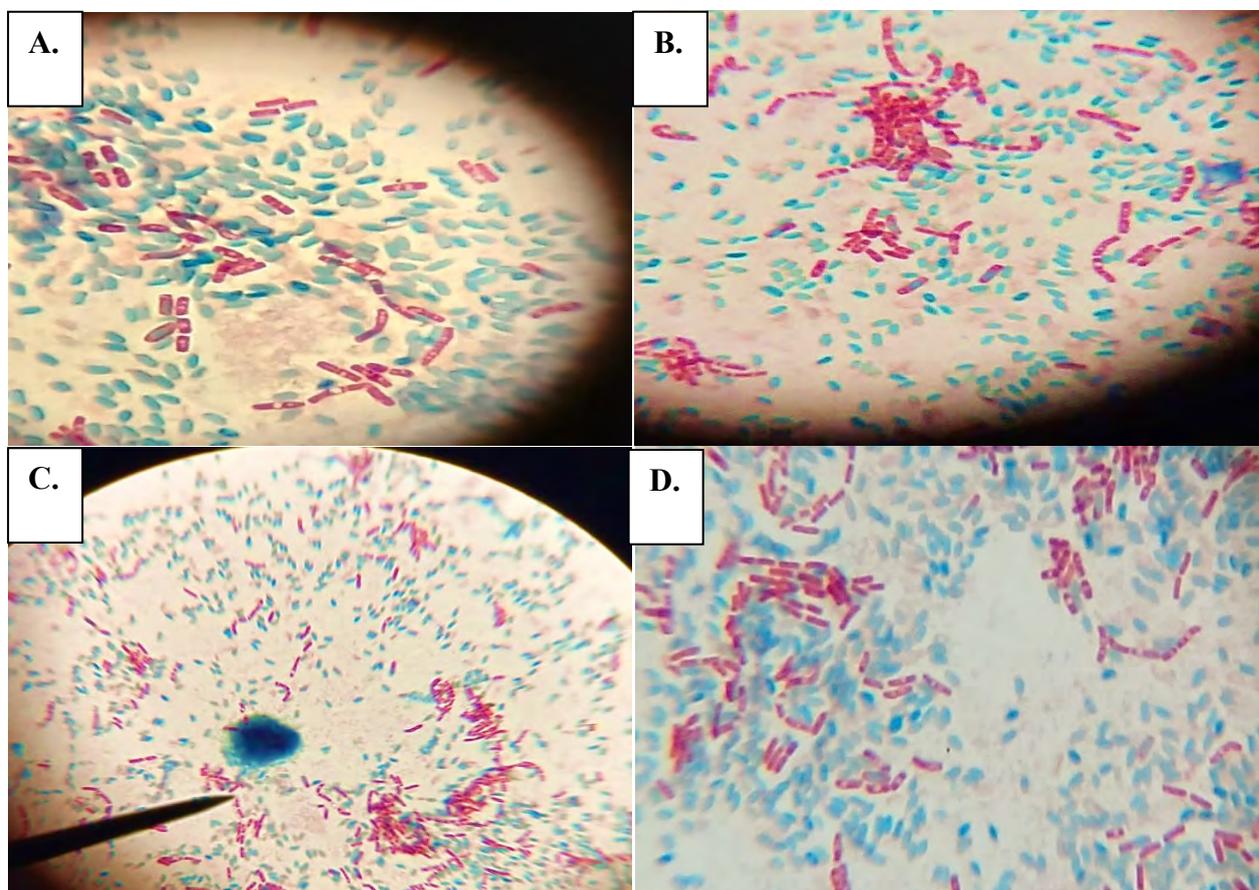
*Observación microscópica de cepas Gram positivas en un aumento de 1000x*



*Nota.* A: C0001; B: C0002; C: C0005 Y D:C0012, E: C0006 y F: C0008

**Figura 15.**

Tinción Shaeffer-Ffulton para la observación de esporas a un aumento de 1000x



*Nota.* A: C0001; B: C0002; C: C0005 Y D:C0012, aumento de 1000x; coloración verde turquesa: esporas presentes

De los resultados en base a las coloraciones presentadas en la tabla 12, se deduce que la cepa C0001, C0002, C0005, C0006, C0008 Y C0012 son Grampositivos (Figura 14) y las cepas C0001, C0002, C0005 y C0012 presentan una espora central, terminal o sub terminal (Figura 15), su presencia es una característica importante del género *Bacillus*. Ambas tinciones son corroboradas por Campaña (2018) y Cuervo Lozada (2010), quienes trabajaron en la identificación del género *Bacillus*. De modo que las cepas restantes serán descartadas para las siguientes evaluaciones.

### 3.2.4 Identificación bioquímica

En la Tabla 13 se presentan los resultados de la identificación bioquímica de 04 cepas Grampositivas aisladas de la ribera del río Salado en el distrito de Espinar. Para la cepa C0001 en la prueba TSI indica fermentación de glucosa (+), la prueba LIA indicador de la descarboxilación de lisina (+), movilidad (+), indol (-), ornitina (-), urea (-), citrato (+), gelatinasa (+) y catalasa (+). Según Carrera (2010), Obando y Suarez (2015) podría tratarse de *Bacillus sp.*; Para la cepa C0002 indica TSI (+), LIA (+), movilidad (+), indol (-), ornitina (-), urea (-), citrato (-), gelatinasa (+) y catalasa (+) según Syed y Chintala (2015) esta lectura indica que podría tratarse de *Bacillus cereus*.

Para la cepa C0005 indica TSI, glucosa (+), LIA (-), movilidad (-), indol (-), ornitina (+), urea (-), citrato (+), gelatinasa (-) y catalasa (+), según Brown et al, (1995) esta lectura corresponde en la mayoría de pruebas al género *Bacillus* con excepción de la fermentación de sacarosa que resulto negativa, sin embargo, el autor reporta esa prueba como positiva.

Para la cepa C0012 indica TSI (+), LIA (+), movilidad (+), indol (-), ornitina (-), urea (-), citrato (+), gelatinasa (+) y catalasa (+), según Ortiz (2023) Obando y Suarez (2015) esta lectura podría tratarse del género *Bacillus*.

**Tabla 13.**

*Identificación bioquímica para 04 cepas Gram positivas y esporuladas, aisladas de la ribera del río Salado de la provincia de Espinar.*

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA												
N°	TSI	Fermentación de azúcares	LIA	MIO			UREA	CITRATO	GELATINASA	CATALASA	Microorganismo	Fuente
				M	I	O						
C0001	K/A	Glucosa +	K/A	+	-	-	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp	Carrera (2010), Obando y Suárez (2015)
C0002	K/A	Glucosa +	K/A	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus cereus</i>	Syed y Chintala (2015)
C0005	K/A	Glucosa+ Sacarosa- Lactosa -	K/K	-	-	+	-	+	-	+	<i>Bacillus</i> sp.	Brown et al, (1995)
C0012	K/A	Glucosa +	K/K	+	-	-	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.	Ortiz (2023), Obando y Suárez (2015)

*Nota.* (+): Positivo, (-): Negativo, M: Movilidad, I: Indol, O: Ornitina

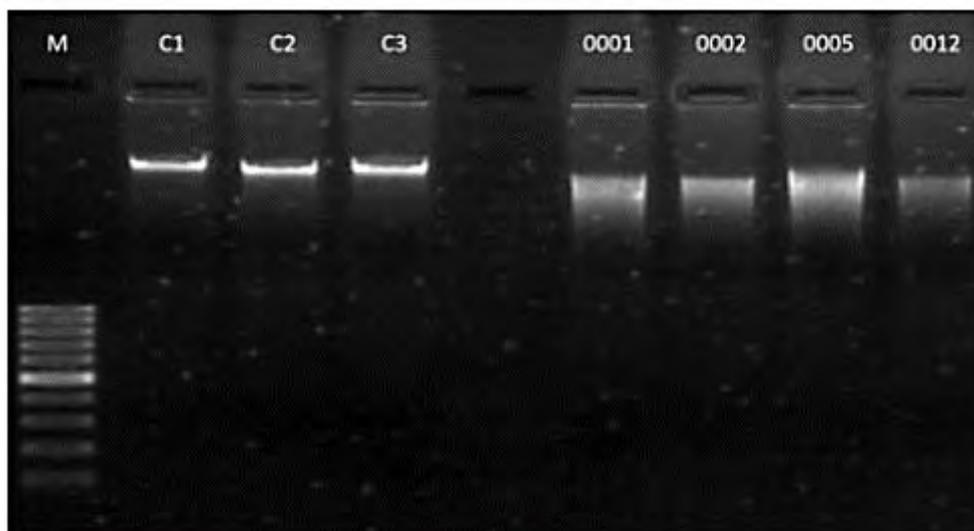
### 3.2.5 Identificación molecular

**Extracción de ADN a partir de cultivos aislados de *Bacillus* sp.** Se utilizó el kit comercial Quick-DNA Fungal/Bacterial Kit de la marca: ZYMO RESEARCH, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante detallados en el ANEXO N°3.

**Cuantificación y visualización de las muestras de ADN.** En la figura 16 se muestra el gel de agarosa al 1% y se detectó la calidad de las muestras de ADN integras y sin fragmentación, es recomendable trabajar con una concentración de ADN que oscila entre 10 ng/uL y 100 ng/uL. De igual forma en la tabla 14 se muestra la pureza de ADN con una relación de A260/280nm donde el rango recomendado debe fluctuar entre 1,8 y 2,1 de modo que todas las cepas cumplen con el estándar de calidad y pureza.

**Figura 16.**

Geles de electroforesis mostrando la calidad de las 04 muestras de ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 1%



Nota. C1, C2 y C3 son controles positivos de *E. coli*, *Klebsiella sp.* y *Pseudomonas sp.* respectivamente, M: marcador de 100bp.

**Tabla 14.**

Medidas de la concentración de ADN y pureza de las muestras del género *Bacillus sp.*

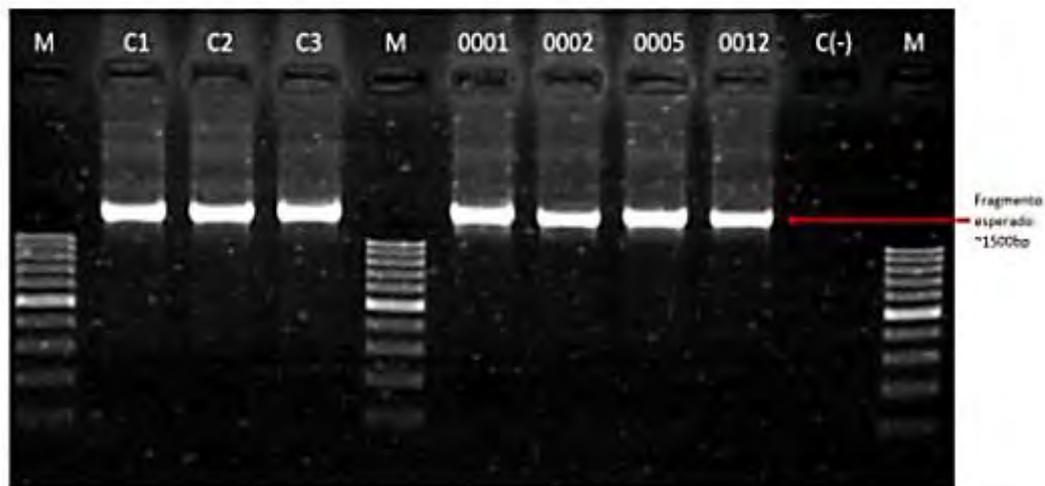
Muestra	Concentración (ng/ul)	Pureza(A260/A280)
C0001	75,6	1,85
C0002	50,0	1,81
C0005	48,6	1,80
C0012	78,6	1,95

Nota. Las muestras C0001, C0002, C0005 y 0012; mostraron una calidad de ADN óptimo e idóneo para el PCR con el marcador moleculares ADNr 16S.

**Amplificación del marcador molecular ADNr 16S mediante PCR.** El proceso de amplificación fue exitoso para las 4 muestras analizadas donde se observó una banda única y definida con un tamaño aproximado de 1500pb (Figura 17).

**Figura 17.**

*Gel de Electroforesis que muestra los productos de ADNr 16S amplificados por PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%*



*Nota.* C1, C2 y C3 son controles positivos de *E. coli*, *Klebsiella sp.* y *Pseudomonas sp.* respectivamente, C (-): control negativo, M: marcador de 100bp.

**Secuenciamiento y análisis bioinformático.** La secuencia consenso obtenida en el análisis bioinformático de ADN del gen 16S fueron comparadas con la base de datos del NCBI utilizando la herramienta BLAST para identificar secuencias homólogas y calcular distancias genéticas (ver ANEXO N°3). Posteriormente, se generó un árbol filogenético utilizando el programa MEGA mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) utilizando la base de datos GenBank. Los resultados de este análisis se detallan en la Tabla 15 y se presentan visualmente en la Figura 18.

**Tabla 15.***Identificación molecular de las 04 cepas de Bacillus sp. identificadas bioquímicamente*

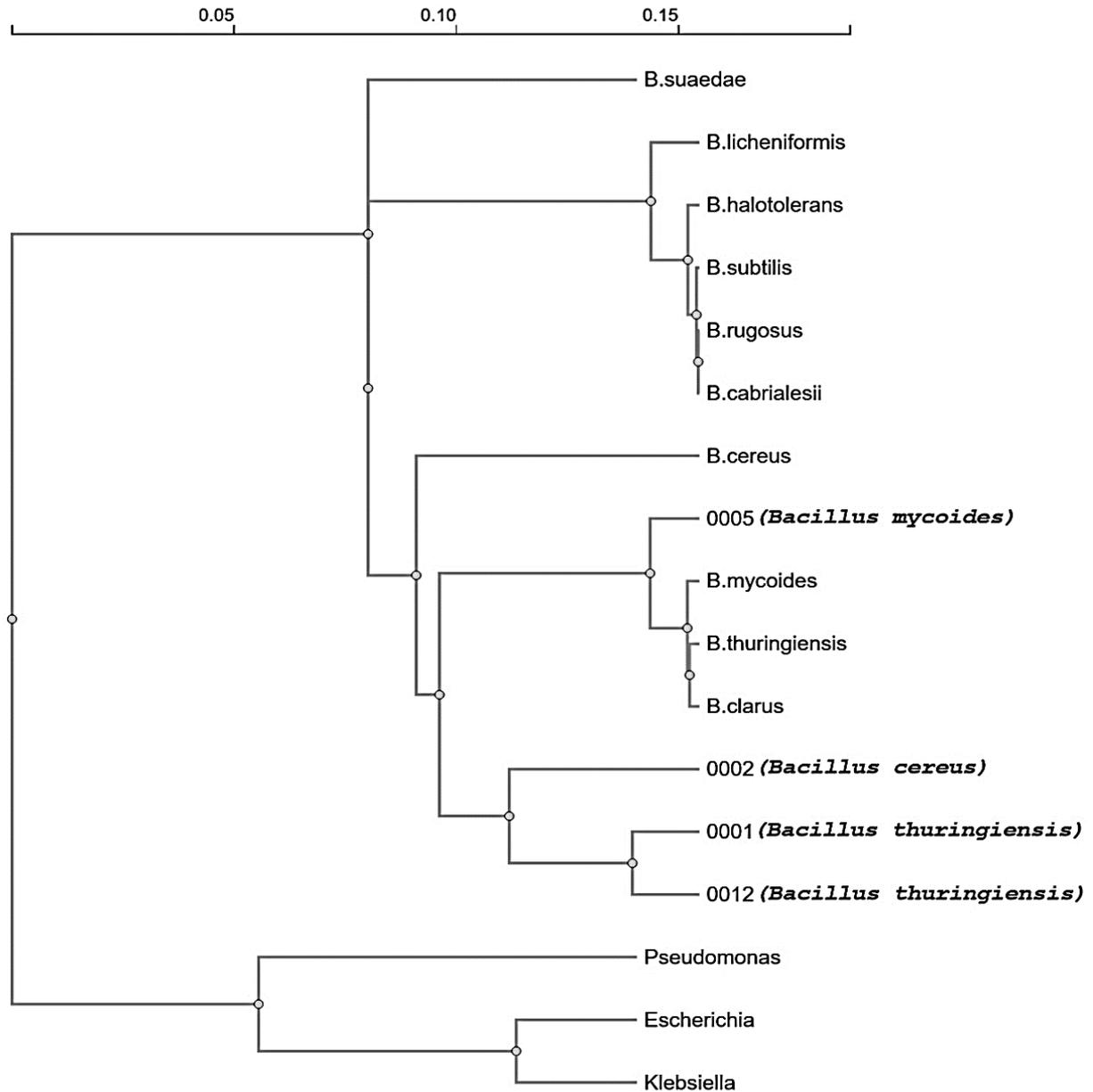
<b>Muestra</b>	<b>Nombre Científico</b>	<b>Porcentaje de cobertura</b>	<b>E-value</b>	<b>Porcentaje de identidad</b>	<b>Longitud de secuencia(pb)</b>
C0001	<i>Bacillus thuringiensis</i>	94%	0.0	98,95%	~1500pb
C0002	<i>Bacillus cereus</i>	88%	0.0	94,27%	~1500pb
C0005	<i>Bacillus mycoides</i>	95%	0.0	100,00%	~1500pb
C0012	<i>Bacillus thuringiensis</i>	93%	0.0	98,39%	~1500pb

*Nota.* (pb): pares de bases

La tabla 15 detalla la identificación molecular donde: C0001 y C0012 fueron identificadas como la especie *Bacillus thuringiensis* con 98,95 y 98,39% de identidad respectivamente. C0002 fue identificada como la especie *Bacillus cereus* con 94,27% de identidad y C0005 fue identificada como *Bacillus mycoides* con 100% de identidad. Información respaldada por el trabajo de Syed y Chintala (2015) donde realizaron la identificación bioquímica semejante a la cepa C0002 (Tabla 13) que corresponde a la identidad *Bacillus cereus* con un 99% de identidad, del mismo modo en el trabajo de Ortiz (2023) donde su identificación bioquímica es semejante al obtenido en el presente estudio para la cepa C0012 (Tabla 13) fue identificado como *Bacillus thuringiensis* con un 100% de identidad.

**Figura 18.**

Árbol filogenético de las 04 cepas: *B. thuringiensis* (C0001), *B. cereus* (C0002), *B. mycooides* (C0005) y *B. thuringiensis* (C0012)



*Nota.* Informe de los resultados llevado a cabo en el Laboratorio de la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia-Lima.

En la figura 18 se representa el árbol filogenético que se generó en base a un modelo de máxima parsimonia se puede observar que existe un grupo control (*Pseudomonas*, *Escherichia* y *Klebsiella*) que forma un clado apartado, se muestra otro clado en el que se

agrupan todas las especies del género *Bacillus*, pero ambos clados comparten un ancestro en común.

Dentro del clado del género *Bacillus*, se puede observar hasta 3 subgrupos en los cuales han sido diferenciados unos de otros en base a las mutaciones o polimorfismos encontrados en sus secuencias de ADN del gen 16S. Se puede observar también que la muestra C0002 está estrechamente relacionada a *Bacillus cereus* quien muestra una longitud de 0,10; mientras que la muestra C0005 con una longitud de 0,15 está estrechamente relacionada a *Bacillus mycoides*. Mientras que las muestras C0001 y C0012 revelan que las longitudes de las ramas son uniformes, lo cual se sustenta con la identificación molecular que confirma que ambas muestras están alineadas con la especie *Bacillus thuringiensis*.

### 3.3 Determinación de la tolerancia máxima de *Bacillus* en diferentes concentraciones de Pb (II).

La concentración óptima de Pb(II) para la evaluación de adsorción se detalló en la tabla 16 y se presentó en la figura 19.

**Tabla 16.**  
*Tolerancia de las 04 cepas identificadas como Bacillus a concentraciones crecientes de Pb (II)*

Cepa	300 ppm Pb (II)	700 ppm Pb (II)	1000 ppm Pb (II)
C0001- <i>B. thuringiensis</i>	+++	++	+
C0002- <i>B. cereus</i>	+++	+++	+
C0005- <i>B. mycoides</i>	++	+	-
C0012- <i>B. thuringiensis</i>	++	+	+

*Nota.* (-): No crecimiento; (+): Escaso crecimiento; (++): Mediano crecimiento; (+++): Alto crecimiento

Se determinó la tolerancia de *Bacillus thuringiensis* (C0001), *Bacillus cereus*(C0002), *Bacillus mycoides*(C0005) y *Bacillus thuringiensis*(C0012), en concentraciones de Pb(II) a 300, 700 y 1000 ppm. Los resultados de tolerancia máxima fueron detallados en la tabla 16: *Bacillus thuringiensis* (C0001) toleró 300 ppm (+++), 700 ppm (++) y 1000 ppm (+); *Bacillus*

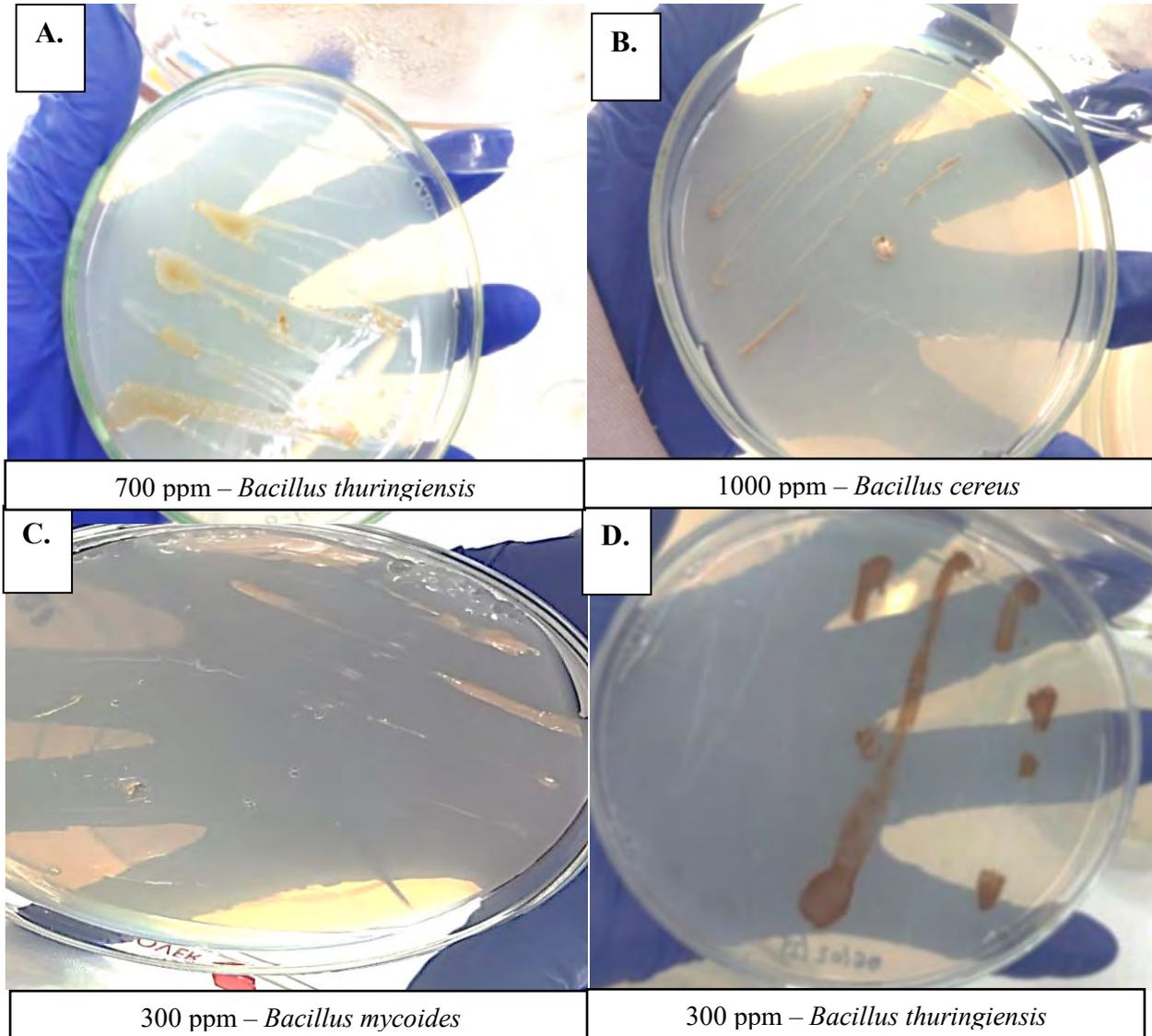
*cereus*(C0002) toleró 300ppm (+++), 700 ppm (+++) y 1000 ppm (+); *Bacillus mycoides*(C0005) toleró 300 ppm (++), 700ppm (+) y 1000 ppm (-) y *Bacillus thuringiensis*(C0012) toleró 300 ppm (++), 700 ppm (+) y 1000 ppm (-).

Según Campaña (2018) las especies del género *Bacillus* tienen una espora central o terminal que le brinda la capacidad de tolerar condiciones extremas como es la concentración alta de plomo. En el trabajo de Soto-Padilla et al., (2016) determinó que la concentración máxima de tolerancia para *Bacillus* sp. fue de 1200 ppm. Mientras que Martínez, et al. (2010) determinó la tolerancia máxima hasta 1,5 mM (416 ppm) de PbCl<sub>2</sub> para el género *Bacillus*. Sin embargo, en el trabajo de Ortiz (2023) determinó que las cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* expuestas a concentraciones crecientes de plomo llegan a tolerar como máximo hasta 135 ppm.

En contraste al presente estudio *Bacillus cereus* (C0002) tiene una mayor tolerancia y *Bacillus mycoides* (C0005) presenta la menor tolerancia. Un aspecto importante que Bautista (2008) menciona es la coloración del cultivo enriquecido con plomo, que se asemeja a un color parduzco por el contacto entre el agar nutritivo y el plomo, detalle que coincide con la investigación ya que se observó una coloración distinta a lo habitual (Figura 19).

**Figura 19.**

*Lectura del cultivo de agar nutritivo enriquecido con 300, 700 y 1000 ppm de Pb(II)*



Según se observa en la Figura 19, el crecimiento óptimo se alcanzó a una concentración de 300 ppm; por lo tanto, esta concentración se establecerá como el estándar máximo para las pruebas de adsorción.

### 3.4 Determinación de la capacidad y eficiencia de *Bacillus sp.* en la adsorción de Pb(II)

#### 3.4.1 Obtención de biomasa seca de *B. thuringiensis* (C0001), *B. cereus* (C0002), *B. mycooides* (C0005) y *B. thuringiensis* (C0012)

El uso de biomasa seca condiciona que las bacterias se encuentren con un metabolismo inactivo por lo que la determinación de adsorción fue más exacta y precisa, debido a la falta de mecanismos de transporte no ocasionaría la bioacumulación del metal (Perez, et al., 2020). La adsorción fue de forma rápida y eficiente en la eliminación de metales y estos pueden ser recuperados con facilidad, sin embargo, están sujetos a la sensibilidad de pH y temperatura (Cañizares, 2000).

**Tabla 17.**

*Peso neto promedio de biomasa seca obtenida a partir de Bacillus*

<b>CEPA</b>	<b>Peso promedio total (g)</b>
C0001- <i>B. thuringiensis</i>	0,187 g
C0002 - <i>B. cereus</i>	0,184 g
C0005 - <i>B. mycooides</i>	0,083 g
C0012 - <i>B. thuringiensis</i>	0,119 g

*Nota.* g: gramos

En la Tabla 17 se muestran los promedios de biomasa seca para cada una de las cuatro cepas de *Bacillus* (Ver ANEXO N° 4). Al comparar estos resultados con los de Bautista (2008), quien reportó una biomasa seca óptima de 0,015 g para su experimento de adsorción, y con los de Qiao et al. (2018), que encontraron una biomasa en el rango de 0,01 g a 0,08 g como óptima, se observa que la biomasa seca obtenida en la Figura 20 es superior al valor promedio utilizado por estos autores. Esto sugiere que las cepas de *Bacillus* en este estudio presentan una biomasa seca mayor a la que fue considerada óptima en investigaciones anteriores.

**Figura 20.**

*Biomasa seca: B. thuringiensis (C0001), B. cereus (C0002), B. mycoides (C0005) y B. thuringiensis (C0012)*



*Nota.* Laboratorio de Fractal Químicos E.I.R.L- Cusco

**3.4.2 Trazabilidad de la curva de calibración para las lecturas de Pb(II)**

Se realizó la calibración entre la absorbancia y la concentración de Pb(II) en microgramos a un pH de 4,2, con el fin de garantizar las lecturas siguientes y originar la ecuación de regresión lineal en el paquete estadístico SOFTWARE ORIGIN – versión 10.5.122.52971. La ecuación de regresión es la siguiente:

$$Y = A + B * x$$

Donde:

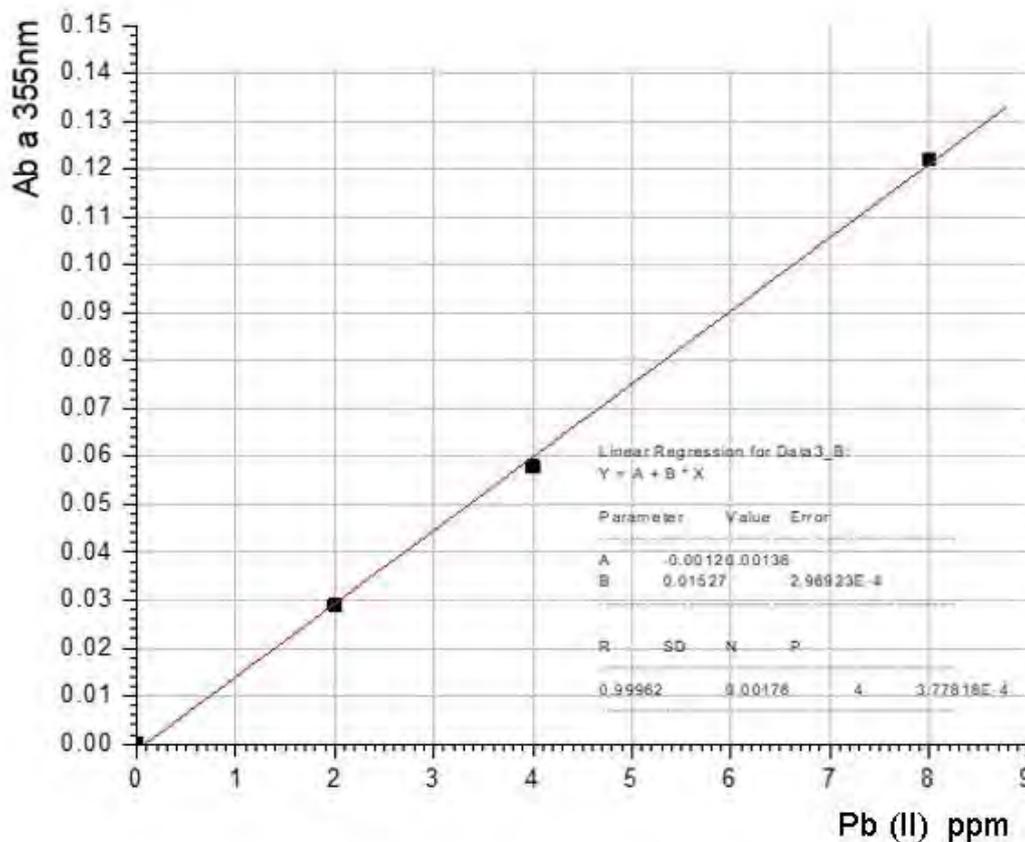
A: -0,0012

B: 0,01527

La recta de calibración obtenida resultó ser lineal (Figura 21), lo cual indica que el equipo esta correctamente calibrado.

**Figura 21.**

*Recta de calibración del equipo espectrofotométrico para el análisis adsorción de Pb(II)*



### **3.4.3 Determinación de la capacidad y eficiencia de adsorción de las cepas de *Bacillus sp***

La capacidad y la eficiencia de adsorción son dos parámetros muy importantes en la evaluación de un adsorbente mientras que en la capacidad se evalúa la cantidad de plomo adsorbido mg/g de biomasa, la eficiencia determina el porcentaje de eliminación del plomo. (Humanante, et al, 2022)

**Tabla 18.**

*Adsorción de Pb(II) por las 04 cepas del género Bacillus en términos de capacidad y eficiencia*

Parámetro	Capacidad de adsorción mg/1g-biomasa			Eficiencia de adsorción (%)		
	50	100	150	50	100	150
<i>Bacillus thuringiensis</i> (C0001)	9,61±0	17,13±1,60	24,00±0,52	99,80%	90,33%	82,86%
<i>Bacillus cereus</i> (C0002)	9,61±0	17,63±1,27	24,30±0,17	99,80%	92,33%	83,68%
<i>Bacillus mycoides</i> (C0005)	9,61±0	14,47±1,12	23,70±0,75	99,80%	76,77%	82,60%
<i>Bacillus thuringiensis</i> (C0012)	9,61±0	16,80±1,11	23,57±0,32	99,80%	82,80%	82,44%

*Nota.* Valores promedio de 3 repeticiones por cepa

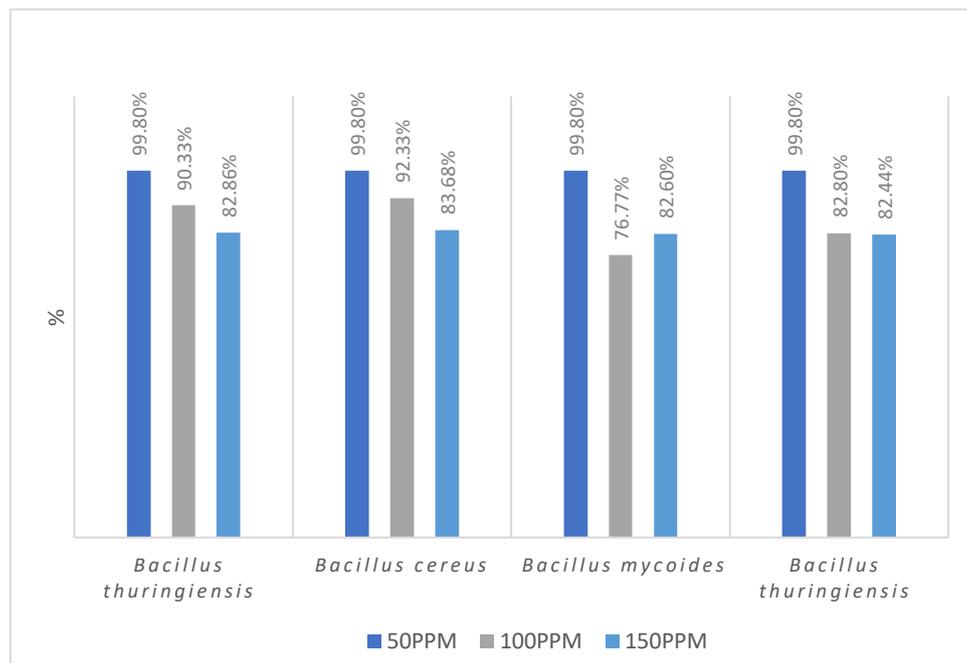
En la tabla 18 se presentan los valores promedio de capacidad y eficiencia de adsorción, siendo la cepa con mayor capacidad de adsorción *Bacillus cereus* (C0002) con un 17,63 mg/g de biomasa a 100 ppm y 24,30 mg/g de biomasa a 150 ppm de plomo; la cepa con menor capacidad de adsorción para 100 ppm fue *Bacillus mycoides* (C0005) con 14,47 mg/g de biomasa, a 150 ppm. *Bacillus thuringiensis* (C0012) con 23,57 mg/g de biomasa. La cepa más eficiente para la adsorción de plomo fue *Bacillus cereus*(C0002) con un 92,33% a 100 ppm y 83,68% a 150 ppm; la cepa menos eficiente fue *Bacillus mycoides* (C0005) con 76,77% a 100 ppm y *Bacillus thuringiensis* (C0012) con 82,44 % a 150 ppm (ver ANEXO N°4).

En comparación con el trabajo de Syed y Chinthala (2015) determinaron un 89% de adsorción de plomo por *B. cereus* (NSPA8.), con un 80% de adsorción *B. licheniformis* (NSPA5) y con una adsorción del 88% por *B. subtilis* (NSPA13). Por otro lado, en el trabajo

de Tur-Naranjo et al., (2012) determinaron la eficiencia de remoción por *Bacillus sp.* con un 83,1% de eficiencia a un pH de 4,2. En el trabajo de Qiao et al., (2019) tuvieron un 78% de reducción de plomo para *B. licheniformis*, 78% de reducción de plomo para *B. cereus* y 86% de reducción para *B. subtilis*. Según Pérez et al (2020) sobre las tecnologías convencionales para la eliminación de metales menciona que el adsorbente debe presentar una capacidad de captura mayor a 15 mg.g<sup>-1</sup>, el presente estudio demuestra la alta capacidad y eficiencia de las especies del género *Bacillus* para la adsorción de plomo inclusive para su uso en tecnologías más grandes como los biorreactores.

**Figura 22.**

*Eficiencia de adsorción de Pb(II) expresado en (%) de B. thuringiensis (C0001), B. cereus (C0002), B. mycooides (C0005) y B. thuringiensis (C0012) aisladas del suelo de la ribera del rio Salado (Espinar-Cusco)*



En la figura 22 se observa que la cepa más eficiente fue *B. cereus* (C0002) que alcanzó un 99,80% de eficiencia a 50 ppm, seguido de un 92,33% a 100 ppm y un 83,68% a 150 ppm.

Se observó que la eficiencia disminuye a medida que aumenta la concentración del plomo, lo que sugiere un punto de equilibrio donde la pared celular de *Bacillus* se satura. Por lo tanto, es crucial estandarizar la concentración de biomasa para lograr los objetivos deseados (Bautista, 2008).

### **3.5 Análisis estadístico**

Para determinar la prueba adecuada se realiza en primera instancia una prueba de normalidad que indica si los datos son paramétricos o no paramétricos mediante el valor de p.

#### ***3.5.1 Prueba de normalidad***

Mediante el estadístico de Anderson Darling (AD) que evaluó la distribución de datos

Donde:

Si  $AD = 0$  los datos son normales

Si  $AD \geq 0$  los datos no son normales

Si  $p < 0,05$  se acepta la Hipótesis alterna

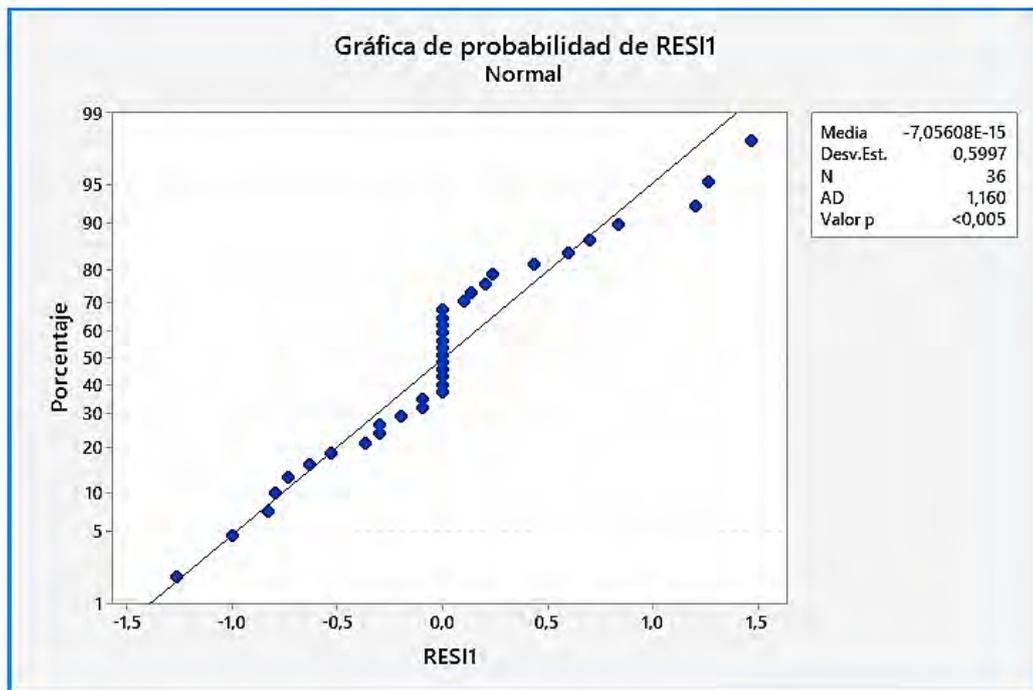
Ho: Los datos se ajustan a la distribución normal

H1: Los datos no se ajustan a la distribución normal

Decisión: Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, entonces la distribución de datos no es normal razón por la cual la prueba inferencial fue no paramétrica (Kruskal-Wallis), sin embargo, se usó adicionalmente el análisis de varianza ANOVA para evaluar la interacción de las variables.

**Figura 23.**

*Prueba de normalidad en el paquete estadístico SPSS - Versión 29.0*



En la figura 23 se observa que los puntos de intersección no están alineados en la recta de trayectoria, el estadístico de Anderson Darling AD fue de 1,160 y el valor de  $p < 0,05$  entonces los datos no se ajustan a una distribución normal

### 3.5.2 Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para capacidad de adsorción

**Tabla 19.**

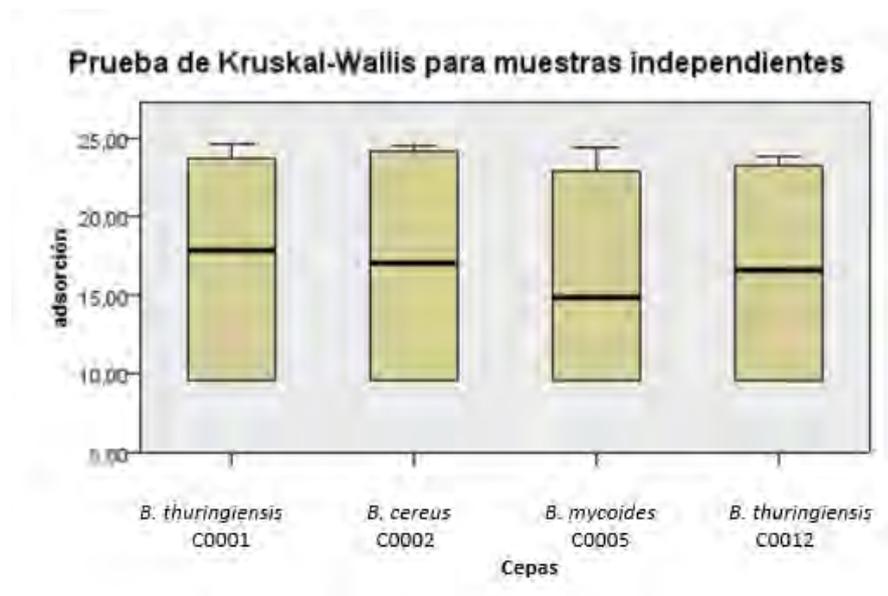
*Prueba de Kruskal - Wallis para contrastar las medianas de la variable cepa y concentración*

Variable	Hipótesis	Significancia asintótica	Decisión
Cepa	Ho: La capacidad de adsorción esta influenciada por las diversas cepas.	0,897	Se rechaza la H1 y se acepta la Ho
	H1: La capacidad de adsorción no está influenciada por las diversas cepas.		
Concentración	Ho: La capacidad de adsorción se mantiene constante con las diferentes concentraciones de Pb (II).	0,000	Se rechaza la Ho y se acepta la H1
	H1: La capacidad de adsorción no se mantiene constante con las diferentes concentraciones de Pb (II).		

El nivel de significancia debe ser de 0,05

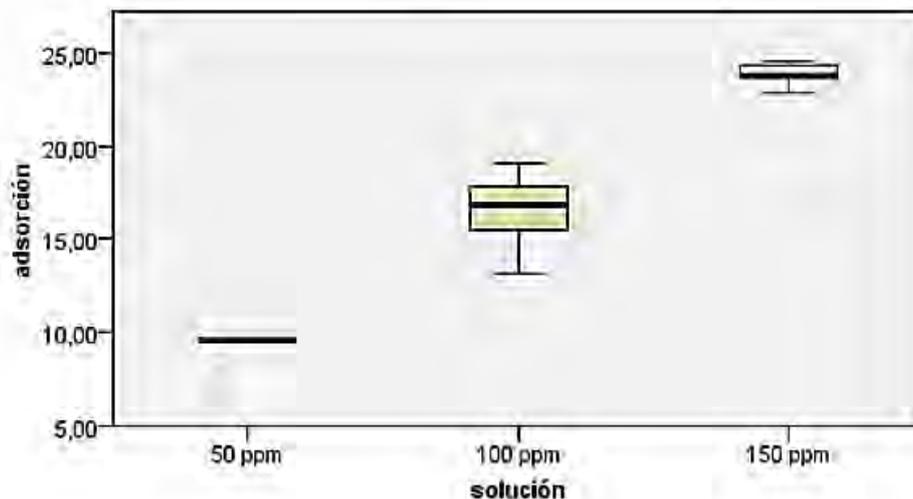
**Figura 24.**

*Prueba de Kruskal-Wallis en diagrama de cajas para la capacidad de adsorción de Pb(II), variable cepa*



**Figura 25.**

*Prueba de Kruskal-Wallis en diagrama de cajas para la capacidad de adsorción de Pb(II), variable concentración (50 ppm, 100 ppm y 150 ppm)*



En la figura 24 se demuestra que no existen diferencias significativas ( $p = 0,897$ ) entre la capacidad de adsorción versus las 04 especies de *Bacillus*; es decir, la capacidad de adsorción esta influenciada por las diferentes cepas del género *Bacillus*, aceptando la hipótesis nula ( $H_0$ ) descrito en la tabla 19, se destaca a *Bacillus cereus* (C0002) que tiene una mayor capacidad de adsorción en relación a las demás cepas. En cuanto a la capacidad de adsorción (Figura 25) versus concentración de Pb(II) 50 ppm, 100 ppm y 150 ppm, existen diferencias significativas ( $p = 0,000$ ); por lo tanto, la capacidad de adsorción no se mantiene constante con las diferentes concentraciones de Pb(II) aceptando la hipótesis alterna ( $H_1$ ) como se describe en la tabla 19.

### **3.5.3 Análisis bifactorial ANOVA entre las interacciones de las variables para evaluar la capacidad de adsorción**

**$H_0$ :** La capacidad de Pb(II) adsorbido es la misma con las 3 concentraciones de Pb(II) (50, 100 y 150 ppm).

**$H_1$ :** La capacidad de Pb(II) adsorbido difiere con las 3 concentraciones (50, 100 y 150 ppm) de Pb(II).

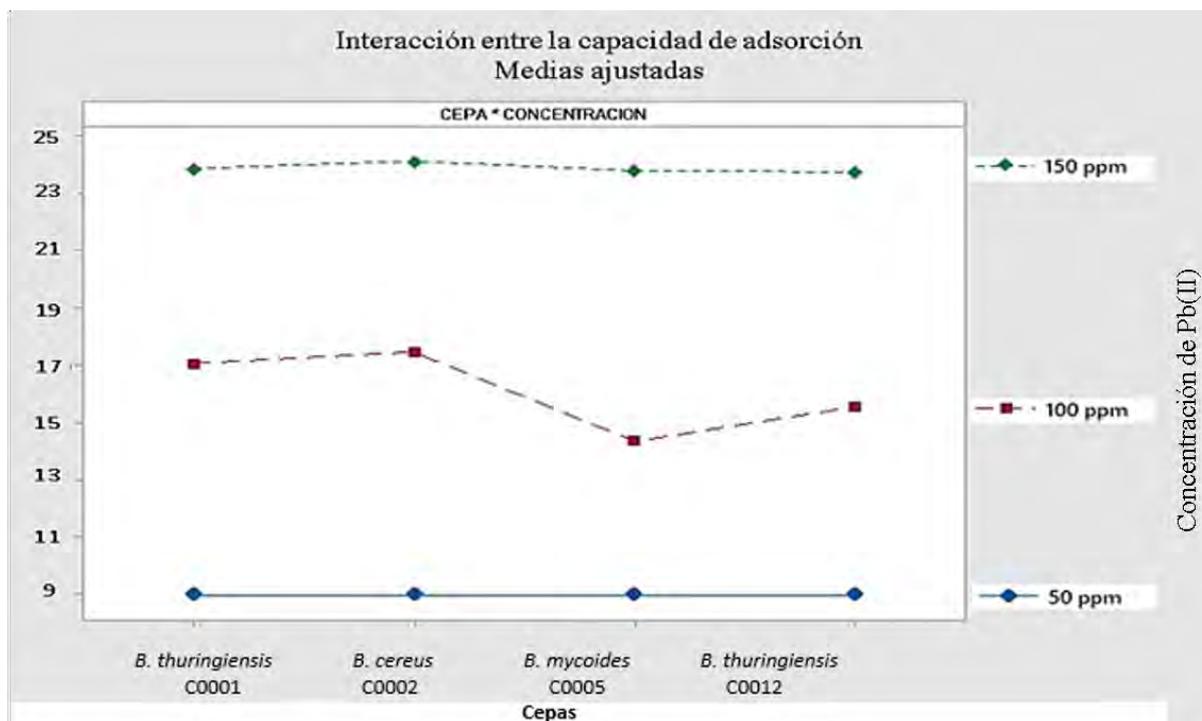
**Tabla 20.**

*Análisis de varianza bifactorial ANOVA para la capacidad de adsorción de Pb(II), variables cepa y concentración de Pb(II)*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	33663,3	3060,3	292,51	0,000
Lineal	5	33379,4	6675,9	638,09	0,000
CEPA	3	183,4	61,1	5,84	0,004
Concentración (Pb II)	2	33196,0	16598,0	1586,47	0,000
Interacciones de 2 términos	6	283,8	47,3	4,52	0,003
CEPA*Concentración	6	283,8	47,3	4,52	0,003
Error	24	251,1	10,5		
Total	35	33914,3			

**Figura 26.**

*Interacción para la capacidad de adsorción entre las variables cepa y concentración de Pb(II)*



Del Análisis de varianza bifactorial ANOVA detallados en la tabla 20 se puede afirmar que existen diferencias significativas en la capacidad de adsorción entre las variables cepa de *Bacillus* y las 3 concentraciones de Pb(II) con  $p = 0,003$ ; por lo tanto, se acepta la hipótesis alterna (H1). La adsorción difiere en cuanto la concentración de plomo incrementa, obteniendo una relación directamente proporcional. Según la figura 26 la cepa con mayor capacidad de adsorción fue *Bacillus cereus* (C0002) a comparación de la cepa con menor capacidad de adsorción *Bacillus mycoides*(C0005).

### 3.5.4 Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para la eficiencia de adsorción

Es una prueba no paramétrica alterna al test ANOVA utilizada para comprobar si se presenta diferencias significativas entre dos o más grupos de una variable independiente.

#### Tabla 21.

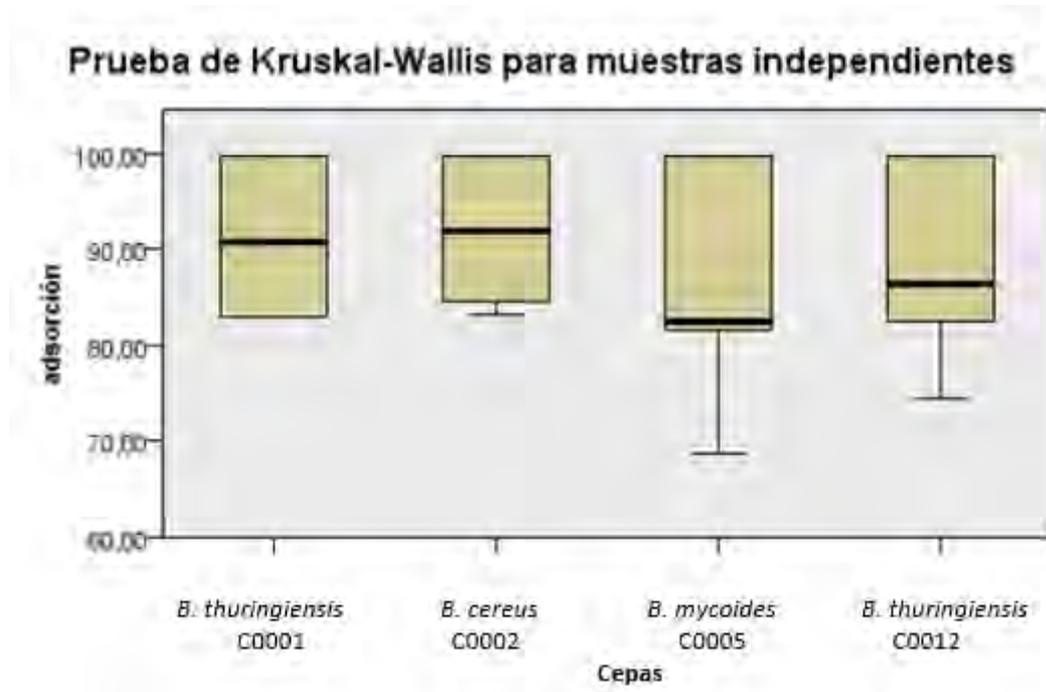
*Prueba de Kruskal-Wallis para contrastar las medianas de la variable cepa y concentración*

Variable	Hipótesis	Significancia asintótica	Decisión
Cepa	Ho: La eficiencia de adsorción esta influenciada por las diversas cepas.	0,330	Se rechaza la H1 y se acepta la Ho
	H1: La eficiencia de adsorción no está influenciada por las diversas cepas.		
Concentración	Ho: La eficiencia de adsorción se mantiene constante con las diferentes concentraciones de Pb (II).	0,000	Se rechaza la Ho y se acepta la H1
	H1: La eficiencia de adsorción no se mantiene constante con las diferentes concentraciones de Pb (II).		

El nivel de significancia debe ser de 0,05

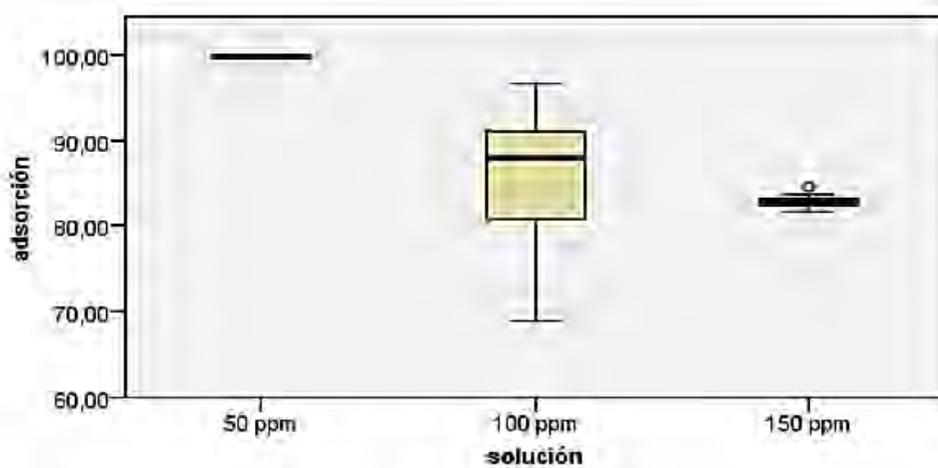
**Figura 27.**

Prueba de Kruskal-Wallis en diagrama de cajas para la eficiencia de adsorción de Pb(II), variable cepa



**Figura 28.**

Prueba de Kruskal-Wallis en diagrama de cajas para la eficiencia de adsorción de Pb(II), variable concentración (50 ppm, 100 ppm y 150 ppm)



En la figura 27 se demuestra que no existen diferencias significativas ( $p = 0,330$ ) para la eficiencia de adsorción de la variable cepa (04 cepas de *Bacillus*); es decir, la eficiencia de

adsorción esta influenciada por las diferentes cepas del género *Bacillus*, aceptando la hipótesis nula (Ho) descrita en la tabla 21, donde resalta *Bacillus cereus* (C0002) que tiene una mayor eficiencia de adsorción en relación a las demás cepas. Con respecto a la eficiencia de adsorción (figura 28) de la variable concentración de plomo (II) (50 ppm, 100 ppm y 150 ppm) existen diferencias significativas ( $p = 0,000$ ); por lo tanto, la eficiencia de adsorción no se mantiene constante frente a diferentes concentraciones de Pb(II) aceptando la hipótesis alterna (H1) descrita en la tabla 21.

### 3.5.5 Análisis bifactorial ANOVA entre las interacciones de las variables para evaluar la eficiencia de adsorción

**Ho:** La eficiencia de adsorción (%) es la misma en las 3 concentraciones (50, 100 y 150 ppm) de *Pb(II)*.

**H1:** La eficiencia de adsorción (%) difiere con las 3 concentraciones (50, 100 y 150 ppm) de *Pb(II)*.

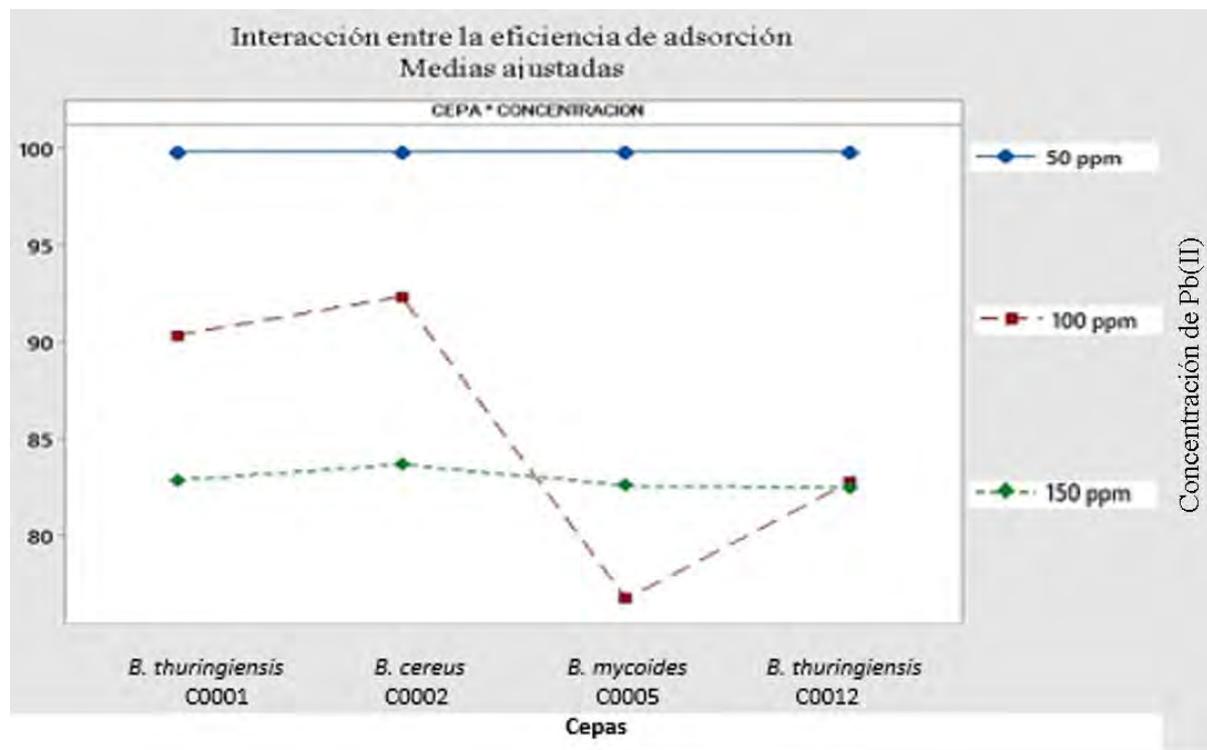
#### Tabla 22 .

*Análisis de varianza bifactorial ANOVA para la eficiencia de adsorción de Pb(II), variables cepa y concentración de Pb(II).*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	2446,6	222,42	21,71	0,000
Lineal	5	2155,6	431,12	42,08	0,000
CEPA	3	172,5	57,51	5,61	0,005
Concentración (Pb II)	2	1983,1	991,53	96,77	0,000
Interacciones de 2 términos	6	291,0	48,50	4,73	0,003
CEPA*concentración	6	291,0	48,50	4,73	0,003
Error	24	245,9	10,25		
Total	35	2692,5			

**Figura 29.**

*Interacción para la eficiencia de adsorción entre las variables cepa y concentración de Pb(II)*



Del Análisis de varianza bifactorial ANOVA detalladas en la tabla 22 se deduce que existe una diferencia significativa ( $p = 0,003$ ) en la eficiencia de adsorción de Pb(II) entre las variables cepa y concentración de Pb(II) (50, 100 y 150 ppm), por lo tanto, se acepta la hipótesis alterna ( $H_1$ ). La eficiencia de adsorción de Pb(II) difiere en cuanto la concentración de plomo incrementa, obteniendo una relación inversamente proporcional. Según la figura 29 la cepa con mayor eficiencia de adsorción fue *Bacillus cereus* (C0002) a comparación de la cepa con menor eficiencia de adsorción *Bacillus mycooides* (C0005). Sin embargo, se observa una disminución en la capacidad de adsorción a 100 ppm, seguida de una recuperación a 150 ppm. Esto podría deberse a procesos de saturación y regeneración de la pared celular. Además, la cepa *Bacillus thuringiensis* (C0012) muestra un punto de intersección en las concentraciones de 100 ppm y 150 ppm, lo que sugiere que esta cepa podría estar experimentando saturación y regeneración en su pared celular según Kumar y Jain (2019) y Bautista (2008).

## CONCLUSIONES

1. La concentración de plomo en las 02 muestras de suelo tomadas en la ribera del río Salado (Espinar – Cusco) fue de 11,31 mg/kg para el punto 1 y 18,12 mg/kg para el punto 2.
2. Se identificó bioquímica y molecularmente 04 cepas aisladas del género *Bacillus*: *Bacillus thuringiensis* (C0001); *Bacillus cereus* (C0002); *Bacillus mycoides* (C0005) y *Bacillus thuringiensis* (C0012).
3. Se determinó la concentración máxima de tolerancia al Pb(II) para *Bacillus thuringiensis* (C0001) se observó un alto crecimiento a 300 ppm, *Bacillus cereus* (C0002) mostró una alta tolerancia a 700 ppm con un alto crecimiento, en contraste *Bacillus mycoides* (C0005) y *Bacillus thuringiensis* (C0012) tuvieron un crecimiento mediano a 300 ppm estableciendo que la concentración óptima de Pb(II) para las cuatro cepas evaluadas fue 300 ppm.
4. La especie con mayor capacidad y eficiencia de adsorción fue *Bacillus cereus* (C0002) con 9,61 mg/g (50 ppm); 17,62 mg/g (100 ppm) y 24,30 mg/g (150 ppm) y una eficiencia de adsorción de 98%; 92,33% y 83,68% respectivamente.
5. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis mostró que tanto la capacidad ( $p = 0,897$ ) y la eficiencia ( $p = 0,330$ ) de adsorción no presentaron diferencias significativas entre las cepas, evidenciando que la variable cepa no tuvo un impacto significativo, en contraste la variable concentración mostró diferencias significativas ( $p = 0,000$ ). Por otro lado, el análisis ANOVA reveló diferencias significativas ( $p = 0,003$ ) cuando se consideraron las interacciones entre cepa y concentración de Pb (II), demostrando que la interacción de ambas variables tuvo un impacto significativo en el proceso de adsorción.

## **RECOMENDACIONES**

1. Explorar la interacción de otros grupos bacterianos con diferentes metales pesados, con el fin de identificar y comparar su potencial de adsorción
2. Evaluar las diferentes condiciones para optimizar la adsorción y estandarizar la producción de biomasa bacteriana para facilitar su escalado biotecnológico.
3. Presentar propuestas de proyectos para la recuperación de medios contaminados a las autoridades de la provincia de Espinar o instituciones interesadas, enfocándose en soluciones innovadoras y sostenibles.

## BIBLIOGRAFÍA

Abbott (2022), Guide learning Clinical Chemistry. <https://cdn.pepperapps.io/diagnostics-cms/public/5fbd61d7685bfe0d9e685c3f>.

Abril Díaz, N., Bárcena Ruiz, A., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado Peinado, J., Meléndez Valdés, F. T., & Túnez Fiñana, I. (2004). "Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas". [Universidad de Córdoba]. [cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fco.83a/doc/fco.83a.pdf](http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fco.83a/doc/fco.83a.pdf)

Acharte Lume, L. M. (2020). Presencia de cadmio y plomo en agua, suelo y su acumulación en pastos naturales de las bocaminas San Antonio y Tangana de la comunidad de Huachocolpa Huancavelica- 2018 [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Huancavelica]. <https://apirepositorio.unh.edu.pe/server/api/core/bitstreams/e8489a95-62b2-48d7-9db6-62c9756fdcf1/content>

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2021). Ficha técnica: Plomo. [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/Plomo\\_ficha](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Plomo_ficha)

Amnistía Internacional. (2021, 10 agosto). Perú: Estado de Salud Fallido: Emergencia de salud en pueblos indígenas de Espinar, Perú - Amnistía Internacional. <https://www.amnesty.org/es/documents/amr46/3829/2021/es/>

Amones Luna, R. M., & Barja Peña, M. R. (2019). Capacidad de acumulación de plomo de las especies adventicias *Amaranthus quitensis*, *Chenopodium ambrosioides* y *Tagetes minuta* en diferentes tipos de suelos.

Apolinario Carmona, G. G. (2018). "Identificación bioquímica y molecular de bacterias patógenas aisladas de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas en Chirgua, Edo. Carabobo, Venezuela", [Tesis - Universidad Central de Venezuela].

Aquino Mallma, K., y Checcori Vargas, C. M. (2021). Revisión Sistemática Técnicas de Remediación para Suelos Contaminados por Metales Pesados. Universidad de Cesar Vallejo.

Areas Blandon Eliett Albina. (2013). *Verificación de los parámetros de desempeño analítico del método para la determinación de calcio por espectrofotometría visible utilizando el Spectroquant Nova 60, realizado en el Laboratorio de Análisis Fisicoquímico de la Sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de Ingeniería de la Facultad de Ingeniería, USAC. Guatemala: USAC.*

Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V., & He, Z. (2016). Metales pesados en suelos de plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en tres regiones del Perú. *Ecología Aplicada*, 15(2), 81-89. <https://doi.org/10.21704/rea.v15i2.747>

Autoridad Nacional del Agua (2013). *Inventario de fuentes de agua superficial en las subcuencas de los ríos Salado y Huayllumayo*. Ministerio de Agricultura y Riego(MINAGRI) y Autoridad Nacional del Agua (ANA).<https://repositorio.ana.gob.pe/bitstream/handle/20.500.12543/46/ANA0000510.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Bautista Hernandez, D. A. (2008). Bioadsorción de metales pesados mediante el uso de biomasa bacteriana aislada de jales mineros. Instituto Tecnológico y de estudios superiores de Monterrey campus estado Mexicano. <https://repositorio.tec.mx/handle/11285/569087>

Beltrán Pineda, M. E., & Gómez Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de metales pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg) Mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: Una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 26. <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.2027>.

Brizuela, J., & Jiménez, Y. (2012). Metodologías aplicadas para el establecimiento de los niveles de referencia para metales pesados en la evaluación de la contaminación en suelos. *Avances en Química*, 7(2), 101-109.

Brown E.R., Moody M.D., Treece E.L., Smith C.W.. Differential diagnosis of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus cereus* var. *mycooides*. *J Bacteriol.* 1958 May;75(5):499-509. doi: 10.1128/jb.75.5.499-509.1958. PMID: 13538915; PMCID: PMC290100

Calvo, P., y Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* Aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Revista Ecología Aplicada*, 9(1), 31-39.

Camelo Espitia, L. D., & Guerra Sandoval, Y. J. (2020). Evaluación de la influencia de factores geomorfológicos e indicadores de calidad de uso del suelo sobre la presencia de metales pesados en el recurso suelo. Caso estudio finca Candamí, municipio de Nimaima, Cundinamarca [Tesis de Grado, Universidad El Bosque]. <https://hdl.handle.net/20.500.12495/3910>

Campana Verdesoto, A. M. (2018). “Identificación microbiológica y molecular mediante PCR en tiempo real de dos bacterias del género *Bacillus*, de interés agrobiotecnológico”. [Tesis de grado, Universidad politécnica Salesiana Sede Quito]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15698>

Canchignia Martínez, F., Auhing Arcos, J., Cedeño Moreira, Á., Carrillo, M., & Bravo, D. (2021). Mitigación de cadmio por microorganismos. En Caja de herramientas para la prevención y mitigación de la contaminación de cadmio en la cadena de cacao- Ecuador (1º, pp. 1-32). [https://cefaecuador.org/wp-content/uploads/2022/05/Guia\\_12.pdf](https://cefaecuador.org/wp-content/uploads/2022/05/Guia_12.pdf)

Cañizares Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de microbiología-Mexico-*, 42(3), 131-143.

Cárdenas Huamán, L. E. (2021). “*Bioacumulación de plomo y cadmio en el tejido muscular de la especie Salmo trutta (trucha) procedentes de 3 ríos de la provincia de Espinar, Cusco-2020*”. [Universidad Nacional Agraria de la Selva]. <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/20.500.14292/1939>

Carrasco F., J., Millas Ortiz, P., Santelices S., C., & Castro F., J. F. (2021). Identificación de microorganismos (*Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, pp. 157-182). <https://hdl.handle.net/20.500.14001/67169>

Carrera Cabezas, M. de L (2010). *Producción de Bacillus thuringiensis, Berliner a nivel de laboratorio*. [Escuela Superior Politécnica de Chimbotazo] <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/214>

Chullo Huamani, G.N. “*Calidad fisicoquímica, bacteriológica y metales pesados del río Cañipía para riego de vegetales y bebida de animales en la provincia de Espinar – Cusco*”. [Universidad Nacional del Altiplano, 2021]. <https://repositorio.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/16633>.

CooperAcción y Oxfam. (2023). Glencore en el Perú: El caso de Antapaccay y un análisis del cumplimiento de los estándares internacional en materia de Debida Diligencia en DD.HH - CooperAcción. <https://cooperaccion.org.pe/publicaciones/glencore-en-el-peru-el-caso-de-antapaccay-y-un-analisis-del-cumplimiento-de-los-estandares-internacional-en-materia-de-debida-diligencia-en-dd-hh/>.

Corrales Ramírez, L. C., Caycedo Lozano, L., Gómez Méndez, M. A., Ramos Rojas, S. J., & Rodríguez Torres, J. N. (2017). Bacillus spp: Una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. NOVA, 15(27), 45-65.

Correa Cuba, Odilon, Fuentes Bernedo, Frida Esmeralda, (2021). Contaminación por metales pesados de la microcuenca agropecuaria del río Huancaray - Perú. a del Perú la Sociedad Química del Perú, 87(1), 26-38. <https://dx.doi.org/10.37761/rsqp.v87i1.320>

Corte Interamericana de Derechos Humanos. (2024). Perú es responsable por la violación a los derechos al ambiente sano, la salud, la integridad personal, la vida, la protección especial de la niñez, el acceso a la información, la participación política y las garantías judiciales y la protección judicial en perjuicio de 80 habitantes de la Oroya. [Comunicado de prensa]. [https://www.corteidh.or.cr/docs/comunicados/cp\\_17\\_2024.pdf](https://www.corteidh.or.cr/docs/comunicados/cp_17_2024.pdf)

Covarrubias, S. A., & Peña Cabriaes, J. J. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 7-21. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.01>

Cuervo Lozada, J. P. (2010). “*Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*”. [Pontificia Universidad Javeriana].

Cuervo-Parra, J. A., Aparicio-Burgos, J. E., Pérez-España, V. H., Morales-Ovando, M. A., Peralta-Gil, M., & Romero-Cortes, T. (2024). Bioquímica de la pared celular de Gram positivas y Gram negativas. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*.

Daly, K., Sharp, RJ y McCarthy, AJ (2000). Desarrollo de sondas oligonucleotídicas y cebadores de PCR para la detección de subgrupos filogenéticos de bacterias reductoras de sulfato. *Microbiología*, 146 (7), 1693-1705.

De los ríos Silva, C. (2021).” *Biorremediación bacteriana del cadmio en suelos agrícolas productores de “Cacao” (Theobroma cacao L.) de la cooperativa agraria industrial Naranjillo, Tingo María, Huánuco*”. [Universidad Ricardo Palma]. <https://hdl.handle.net/20.500.14138/4535>.

Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM (31 de Julio del 2017) normas legales N° 761-2017-MINAM/SG, El peruano 01 de agosto del 2017. <https://spij.minjus.gob.pe/Graficos/Peru/2017/Junio/07/DS-004-2017-MINAM>.

Del Carpio. J. (2017). “*Estudio de la bioadsorción de pb (II) y cd (II) usando como biomasa a Escherichia coli aislada de las aguas contaminadas del río Huatanay de la ciudad del Cusco*”[tesis de doctorado, Universidad Nacional de san Agustín de Arequipa]. <https://repositorio.unsa.edu.pe>

Díaz Rodríguez, Y., Mendiola Lau, L., González Suárez, A., Rivas Trasancos, L., Romero Silva, R., Díaz Rodríguez, Y., Mendiola Lau, L., González Suárez, A., Rivas Trasancos, L., & Romero Silva, R. (2021). CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE MATERIALES NATURALES PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS DE PROCESO DE LA ACTIVIDAD PETROLERA. *Centro Azúcar*, 48(3), 41-52.

Dörr, T., Moynihan, P. J., & Mayer, C. (2019). Editorial: Bacterial Cell Wall Structure and Dynamics. *Frontiers in microbiology*, 10, 2051. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02051>

Dueñas Pacheco. C , y Quispe Apaza, F. (2011). “*Resistencia a metales pesados antibióticos de Pseudomonas spp. aisladas de los rios Salado y Cañipia, Espinar-Cusco*”. [Universidad Nacional San Antonio Abad Del Cusco].

Dussán Garzón, J. (2006). “Diversidad de *bacillus sphaericus* en diferentes hábitat y regiones geográficas.” [Universidad de los Andes - Bogotá]. <https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/a04412be-f352-4ae5-9325-33ec8545caf2>

EPA (Environmental Protection Agency). (2021). Plomo [Collections and Lists]. <https://espanol.epa.gov/plomo>

Fernandez Ochoa, B. H., Mullisaca Contreras, E., & Huanchi Mamani, L. E. (2022). Nivel de contaminación del suelo con arsénico y metales pesados en Tiquillaca (Perú). *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 24(2), 131-138. <https://doi.org/10.18271/ria.2022.416>

Gándara Ledezma, A., & Gutiérrez Coronado, M. A. (2023). Efecto de microorganismos promotores de crecimiento vegetal y yeso agrícola en el cultivo de higo.

CIBA Revista Iberoamericana De Las Ciencias Biológicas Y Agropecuarias, 12(23), 1 - 21.

<https://doi.org/10.23913/ciba.v12i23.116>

Garcés Jaraba, L. E., & Coavas Romero, S. C. (2012). Evaluación de la capacidad de adsorción en la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) modificada con quitosano para la remoción de Cr (VI) en aguas residuales [Tesis de Grado, Universidad de Cartagena]. <https://repositorio.unicartagena.edu.co/bitstream/handle/11227/140/tesis%20Garces-Coavas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Glibota Rschichuchi, N. A. (2019). Evaluación de la coexistencia a metales pesados y antibióticos en microorganismos procedentes de suelos de olivar ecológico y tradicional de la provincia de Jaén. Mecanismos moleculares implicados. [Tesis de Doctorado, Universidad de Jaén].

<https://ruja.ujaen.es/bitstream/10953/1158/1/Tesis%20Doctoral%20Nicolas%20Glibota.pdf>

Gonzales, GF, Zevallos, A., Gonzales-Castañeda, C., Nuñez, D., Gastañaga, C., Cabezas, C., ... & Steenland, K. (2014). Contaminación ambiental, variabilidad climática y cambio climático: una revisión del impacto en la salud de la población peruana. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 31, 547-556.

González Meléndez, R. C., Elizalde Cuevas, B., Cortés Cruz, M. E., & Orduña Sánchez, M. (2020). *Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico* (p. 238) Universidad Nacional Autónoma de México.

Govin Sanjudo, A., Reyes Palmero, M. de la C., Guerra Quintana, M., & Sánchez López, M. I. (2020). Caracterización de bacterias resistentes a metales pesados aisladas de un residual minero cubano. *Minería y Geología*, 36(2), 188-203.

Guzmán Martínez, F. (2022). Evaluación de la peligrosidad de los elementos potencialmente tóxicos presentes en residuos mineros abandonados [Tesis de Doctorado, Universidad Politécnica de Madrid]. <https://doi.org/10.20868/UPM.thesis.71891>

Hernández-Acosta, E., Hernández, V. S. P., Zaragoza, V. M. D., & Morales, A. V. (2020). Biodisponibilidad y acumulación de plomo y cobre en *Prosopis laevigata* establecida en depósitos mineros. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 7(2), 00. <https://doi.org/10.19136/era.a7n2.2311>

Herrera Vargas, J.P (2014). “*Aislamiento de bacterias resistentes al plomo a partir de suelos contaminados con este metal*”. [Universidad Nacional Costa Rica].

Huamani Paccaya, W. (2015). “Gran minería y conflictos socioambientales: el caso del distrito de Espinar, Cusco”. Universidad Nacional Agraria la Molina.

Humanante Cabrera, Juan José, Moreno Alcivar, Lucrecia Cristina, Grijalva-Endara, Ana, Tinedo, Ricardo Williams Saldoya, & Tomalá, Joan Alberto Suárez. (2022). Eficiencia de remoción e impacto del sistema de tratamiento de aguas residuales del sector urbano y rural de la Provincia de Santa Elena. *Manglar*, 19(2), 177-187. Epub 15 de junio de 2022. <https://dx.doi.org/10.17268/manglar.2022.022>

Instituto Geológico Minero y Metalúrgico. (2013). Informe integrado de monitoreo sanitario y ambiental participativo de la provincia de Espinar. Informe complementario II. Informe II. <https://hdl.handle.net/20.500.12544/4472>

Kumar, M., & Jain, S. (2019). Heavy metal biosorption by bacterial biomass: Mechanisms, processes, and applications. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(17), 17143-17161

Lago Vila, M. (2018). Biodisponibilidad de metales pesados en suelos contaminados [Tesis de Doctorado, Universidad de Vigo]. [https://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/bitstream/handle/11093/1123/Tesis%20Manoel%20Lago%20Vila\\_sin%20proteccion.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/bitstream/handle/11093/1123/Tesis%20Manoel%20Lago%20Vila_sin%20proteccion.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

León Mendoza, L. H. (2014). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de las enterobacterias aisladas de la rizosfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Scientia Agropecuaria*, 5(4), 177-185. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.04.02>

Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, ME, Salgado, I., Olivares, S., Lima, L., & Rodríguez, D. (2010). Resistencia a antibióticos ya metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* , 41 ( ), 1-10

Mena Alberca, M. P., y Rafael Campos, H. A. (2017). “*Biorremediación de metales pesados con aislados microbianos procedentes de pasivos ambientales mineros y aguas del río Hualgayoc – Cajamarca*”. [Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/994>

MINEM/CM. N° 529-2019. Normas y Documentos Legales - Ministerio de Energía y Minas - Plataforma del Estado Peruano. <https://www.gob.pe/institucion/minem/normas-legales/346029-529-2019-minem-cm>

Municipalidad Provincial de Espinar. (2022). *Mejoramiento del servicio de intercambio intercultural con carácter interdisciplinario y manifestaciones culturales, artísticas y recreativas de los 8 distritos de la provincia de Espinar–Departamento del Cusco*.  
Municipalidad Provincial de Espinar. <https://repositorioprovincial.muniespinar.gob.pe/vistas/archivo/LIB20221109>

Ñacato Suntaxi, C. A., & Valencia Gordón, M. F. (2016). *Aislamiento, identificación y pruebas in vitro de cepas autóctonas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de Alternaria spp en Brassica oleracea var.italica*. [bachelorThesis]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12144>

Obando Rosales, O. R., & Suárez Quintero, Y. G. (2015). Obtención de cepas autóctonas de Bacillus spp. y su evaluación probiótica in vitro [Tesis de Grado, Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/3213/1/tnl70o12.pdf>

Obeso Dias, S. (2024). Connection: OD, Absorbance, and Transmittance in Spectrophotometry. byonoy.com. <https://byonoy.com/journal/understanding-od-absorbance-transmittance-spectrophotometry/>

Ortiz Macarena, R. (2023). “*Estudio de la resistencia y capacidad de remoción de metales y metaloides en bacterias aisladas de suelos contaminados por la actividad minera en el municipio de Concepción del Oro en el estado de Zacatecas*”. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Aguascalientes]. <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/2838/467487.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Osores Plenge, F. (2016). Diagnóstico de salud ambiental humana en la provincia de espinar-cusco. <https://media.business.org>.

Pacheco Salinas, K. K. (2019). Determinación de los niveles de concentración de plomo en la sangre y problemas en la salud en el poblador del Distrito de Chaupimarca, Provincia y Región Pasco, año 2019. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrion. <http://repositorio.undac.edu.pe/handle/undac/1000>

Pérez-Cordero, A., Barraza-Roman, Z., & Martínez-Pacheco, D. (2015). Identificación de Bacterias Endófitas Resistentes a Plomo, Aisladas de Plantas de Arroz1. *Revista de Agronomía Mesoamericana*, 26(2), 267-276.

Pérez, L., Martínez, A., Salgado, I., Valdés, L. A., Cruz, M., Veitía, S. A., Collazo, O., Liva, M., Carballo, M. E. (2020). Remoción bacteriana de cinc y cadmio: Estudio de factores asociados con el proceso / Zinc and cadmium removal by bacteria: Study of factors associated to the process. *Tecnología y ciencias del agua*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.24850/j-tyca-2020-03-09>

Pérez Valdivieso, E., & Almazán González, V. M. (2015). “*Síntesis de nanopartículas de plata y estudio de la estabilidad temporal de sus propiedades ópticas*”, [Tesis de Posgrado, Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. POSGRADO].

Qiao, W., Zhang, Y., Xia, H., Liu, S., Wang, S., & Wang, W. (2019). Bioimmobilization of lead by *Bacillus subtilis* X3 biomass isolated from lead mine soil under promotion of multiple adsorption mechanisms. *The Royal Society Publishing*, 10. <https://doi.org/10.1098/rsos.181701>

Ramírez Cota, M., Escobar Sánchez, O., & Betancourt Lozano, M. (2023). Metales pesados: Antagonistas de la salud en México. *Ciencia*, 74(3), 6.

Rendina, A. E. (2015). Formas geoquímicas, biodisponibilidad potencial y enriquecimiento de metales pesados en sedimentos del río Matanza- Riachuelo en ambientes agropecuarios, urbanos e industriales de la cuenca [Tesis de Doctorado, Universidade da Coruña]. [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/15654/Rendina\\_AliciaElena\\_TD\\_2015.pdf?sequence=4&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/15654/Rendina_AliciaElena_TD_2015.pdf?sequence=4&isAllowed=y)

Reyes, Y. C., Vergara, I., Torres, O. E., Díaz, M., & González, E. E. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, 16(2), 66-77.

Riffo Acuña, M. (2022). “*Determinación de elementos esenciales y tóxicos en alforfón (fagopyrum esculentum) por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente*”. [Universidad de Concepción Facultad de Ciencias Químicas].

Rosales Huamani, J. A., Centeno Rojas, L., Cajacuri Perez, J. R., Breña Ore, J., & Chávez Chapana, C. (2021). Identificación de Cadmio y Plomo en los cultivos de Cacao ubicados en la zona de Satipo - Junín. *TECNIA*, 31(2), 83–89. <https://doi.org/10.21754/tecnia.v21i2.1062>

Rosero Valles, D. E. (2017). Fundamento y aplicaciones de sistemas de especiación con «Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente» (LC-ICP-MS y GC-ICP-MS) [Tesis de Grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <https://repositorio.puce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/bed3e8fa-ee00-4cbd-84b9-b68ff1d0d1f8/content>

Sanga Flores, J. (2016). “*Biosorción de plomo por biomasa inactiva de bacterias aisladas en sedimentos de lixiviados del botadero de Haqira – Cusco*”. [Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco]. <http://hdl.handle.net/20.500.12918/2685>

Soto-Padilla, M. Y., Orozco, D. N. C., Tavizón, E. F., Solís, S. S., & Chargoy, C. E. D. (2016). Potencial de remoción de plomo mediante bacterias aisladas del sedimento de laguna San Juan, Ascensión, Chihuahua. *Tecnociencia Chihuahua*, 10(3), 161-167.

Syed, S., y Chintala, P. (2015). Heavy Metal Detoxification by Different *Bacillus* Species Isolated from Solar Salterns. *Hindawi Publishing Corporation*, 2015, 8. <https://doi.org/10.1155/2015/319760>

Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortiz, Á., & Garcés-Jaraba, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Revista TecnoLógicas*, 18(34), 109-123.

Tur Naranjo, E., Orberá Ratón, T. de los milgros, Romagosa Álvarez, Y., y Pérez Silva I, R. M. (2012). Bioadsorción de plomo (II) por biomasa microbiana seca: Efecto del pH.

Vargas Osorio, L. J. (2017). Evaluación de indicadores microbiológicos en el suelo de un área impactada por la minería de Oro, en el Municipio de Santa Isabel -Tolima [Tesis de Grado, Universidad del Tolima]. <https://repository.ut.edu.co/server/api/core/bitstreams/e30a3d0b-37d9-444b-a171-049b8a9e2f70/content>

Villareal Delgado, M. F., Villa Rodríguez, E. D., Cira Chávez, L. A., Estrada Alvarado, M. I., Parra Cota, F. I., & Villalobos, S. de los S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

World Health Organization: WHO. (2022, 31 agosto). Intoxicación por plomo y salud. OMS, Organización Mundial de la Salud. Recuperado 4 de abril de 2024, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>

Zapata Sarmiento D.H., Sepúlveda Jiménez G., Rodríguez Monroy M. (2022). Microorganismos benéficos para la agricultura como aliados ante la contaminación de los suelos por metales pesados. Ciencia. <https://acmor.org/publicaciones/microorganismos-beneficos-para-la-agricultura-como-aliados-ante-la-contaminacion-de-los-suelos-por-metales-pesados#:~:text=En%20la%20biomineralizaci%C3%B3n%20los%20metales,estado%20de%20oxidaci%C3%B3n%20o%20metilaci%C3%B3n.>

Zavala Hernández, M. (2007). *Aislamiento e identificación de microorganismos autóctonos resistentes a metales pesados* [Masters, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/21239/>.

## **ANEXOS**

## ANEXO N° 1

FOTOGRAFIAS DE LA EVALUACION DE CEPAS DE *Bacillus* sp. CON CAPACIDAD DE ADSORBER PLOMO(II), AISLADOS DEL SUELO DE LA RIBERA DEL RIO SALADO (ESPINAR-CUSCO) Rio Salado



Fotografías realizadas *In situ* en los puntos de muestreo, rio Salado, Provincia de Espinar – Cusco

## Toma de muestra



Toma de muestras de la ribera del rio Salado - Espinar

## Ubicación de calicata



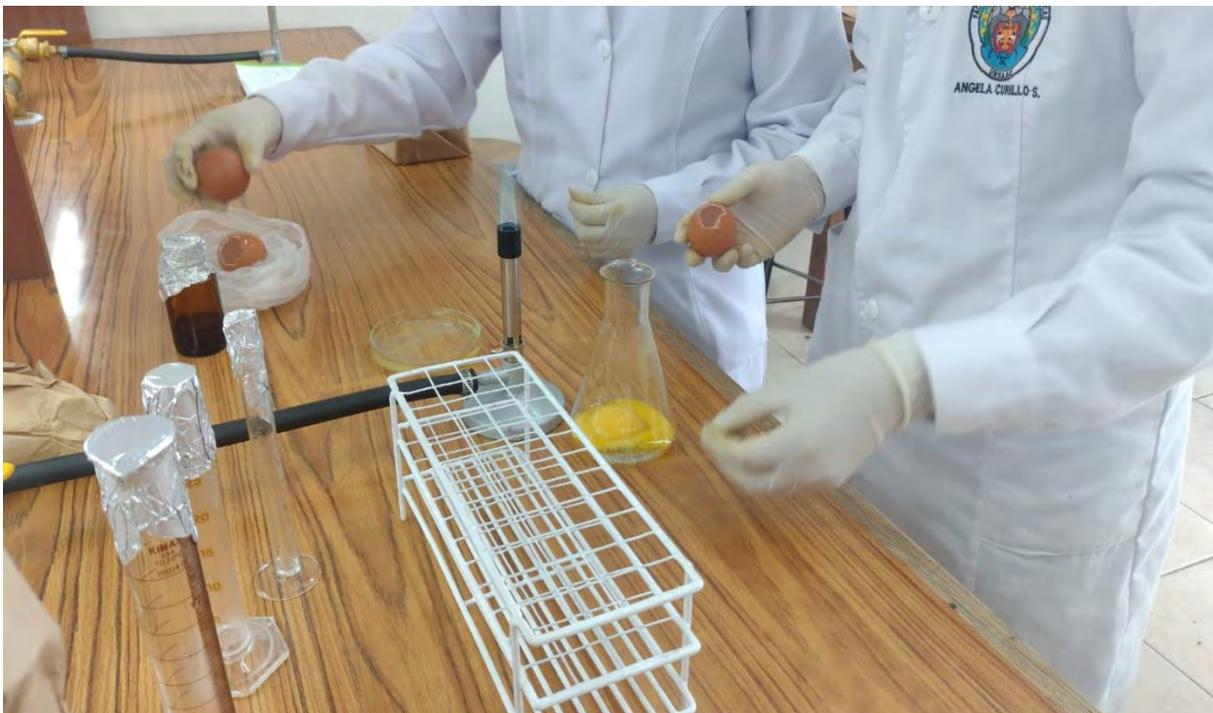
Formación de la calicata en forma de "V" a una profundidad de 15 cm.

## Diluciones seriadas de la muestra de suelo



Elaboración de diluciones seriadas

## Preparación de medios y cultivo



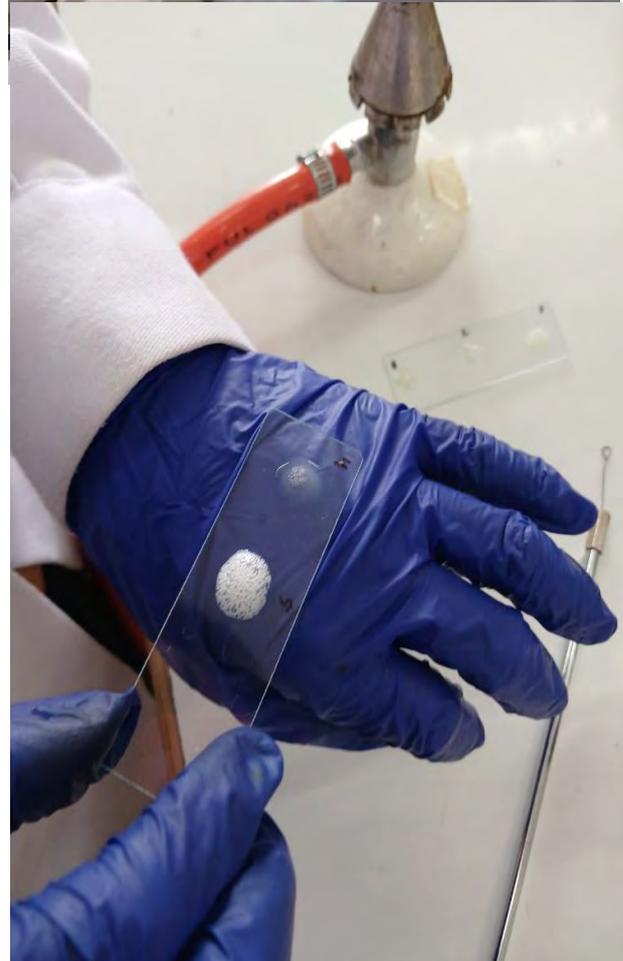
Preparación de Agar MYP (Manitol Yema de huevo – Polimixina).

## Aislamiento de las cepas



Primer aislamiento de 12 cepas bacterianas.

## Tinciones e identificación bioquímica



Identificación bioquímica y selección en base a sus características metabólicas.

## Pruebas de tolerancia



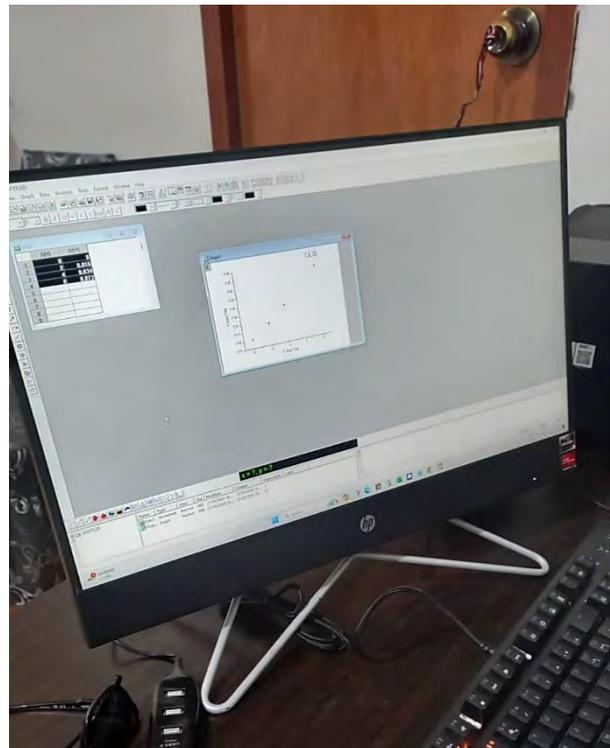
## Producción de biomasa



Preparación de caldo nutritivo para la producción de biomasa en 120 horas.



### Experimentos de adsorción (lecturas espectrofotométricas)



**ANEXO N° 2**  
**BARRIDO DE 25 METALES POR EL MÉTODO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS CON**  
**PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE-CERPER LIMA**



**LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL**  
**ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL – DA**  
**CON REGISTRO N° LE - 003**



**INFORME DE ENSAYO N° 1-11807/23**

Pág. 2/2

Ensayo	LDM	Unidad	Resultados	
Metales por ICP-MS	Aluminio (Al)	0,05	mg/kg	5,946
	Antimonio (Sb)	0,02	mg/kg	<0,02
	Arsénico (As)	0,05	mg/kg	10,56
	Bario (Ba)	0,015	mg/kg	62,5
	Berilio (Be)	0,015	mg/kg	<0,015
	(*) Bismuto (Bi)	0,05	mg/kg	<0,05
	Cadmio (Cd)	0,02	mg/kg	0,062
	Cobalto (Co)	0,03	mg/kg	5,52
	Cobre (Cu)	0,03	mg/kg	40,4
	Cromo (Cr)	0,05	mg/kg	8,54
	(*) Estaño (Sn)	0,025	mg/kg	0,226
	(*) Estroncio (Sr)	0,045	mg/kg	86,2
	(*) Litio (Li)	0,025	mg/kg	10,2
	Manganeso (Mn)	0,025	mg/kg	349
	Mercurio (Hg)	0,01	mg/kg	<0,01
	(*) Molibdeno (Mo)	0,02	mg/kg	<0,02
	Níquel (Ni)	0,035	mg/kg	5,82
	Plata (Ag)	0,005	mg/kg	<0,005
	Plomo (Pb)	0,02	mg/kg	11,31
	Selenio (Se)	0,05	mg/kg	<0,05
	Talio (Tl)	0,025	mg/kg	0,1744
	(*) Teluro (Te)	0,05	mg/kg	<0,05
	(*) Titanio (Ti)	0,05	mg/kg	108,8
	(*) Uranio (U)	0,005	mg/kg	0,454
	Zinc (Zn)	0,05	mg/kg	42,8

LDM: Límite de detección del método

(\*) "Los resultados obtenidos corresponden a métodos que no han sido acreditados por el INACAL - DA"

**MÉTODOS**

**Metales por ICP-MS:** EPA Method 6020B (Preparación de muestra: EPA Method 3051A, 2007). 2014. Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils)

**OBSERVACIONES**

Prohibida la reproducción parcial de este informe, sin la autorización escrita de CERPER S.A.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de la calidad de la entidad que lo produce.

Callao, 15 de septiembre de 2023

RF

Firmado Digitalmente  
 CERTIFICACIONES DEL PERU S.A.  
  
 ELIUS ANDRÉS GÓMEZ ASSURZA  
 REPRESENTANTE LEGAL

**"Este informe de ensayo, al estar en el marco de la acreditación del INACAL – DA, se encuentra dentro del ámbito de reconocimiento multilateral/mutuo de los miembros firmantes de IAAC e ILAC"**

**"Este documento sin firma digital carece de validez"**

AREQUIPA  
 Calle Teniente Rodríguez N° 1415  
 Miraflores – Arequipa  
 T. (054) 265572

CALLAO  
 Oficina Principal  
 Av. Santa Rosa 601, La Perla – Callao  
 T. (511) 319 9000



[info@cerper.com](mailto:info@cerper.com) – [www.cerper.com](http://www.cerper.com)

" EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE"

**INFORME DE ENSAYO N° 1-11808/23**

Pág. 2/2

Ensayo	LDM	Unidad	Resultados	
Metales por ICP-MS	Aluminio (Al)	0,05	mg/kg	7 876
	Antimonio (Sb)	0,02	mg/kg	<0,02
	Arsénico (As)	0,05	mg/kg	8,78
	Bario (Ba)	0,015	mg/kg	121,3
	Berilio (Be)	0,015	mg/kg	<0,015
	(*) Bismuto (Bi)	0,05	mg/kg	<0,05
	Cadmio (Cd)	0,02	mg/kg	0,03736
	Cobalto (Co)	0,03	mg/kg	5,20
	Cobre (Cu)	0,03	mg/kg	112,6
	Cromo (Cr)	0,05	mg/kg	6,06
	(*) Estaño (Sn)	0,025	mg/kg	0,267
	(*) Estroncio (Sr)	0,045	mg/kg	112,1
	(*) Litio (Li)	0,025	mg/kg	7,4
	Manganeso (Mn)	0,025	mg/kg	319
	Mercurio (Hg)	0,01	mg/kg	<0,01
	(*) Molibdeno (Mo)	0,02	mg/kg	0,465
	Níquel (Ni)	0,035	mg/kg	5,02
	Plata (Ag)	0,005	mg/kg	<0,005
	Plomo (Pb)	0,02	mg/kg	18,12
	Selenio (Se)	0,05	mg/kg	<0,05
	Talio (Tl)	0,025	mg/kg	0,2961
	(*) Teluro (Te)	0,05	mg/kg	<0,05
	(*) Titanio (Ti)	0,05	mg/kg	15,88
(*) Uranio (U)	0,005	mg/kg	0,3061	
Zinc (Zn)	0,05	mg/kg	55,3	

LDM: Límite de detección del método

(\*) Los resultados obtenidos corresponden a métodos que no han sido acreditados por el INACAL - DA

**MÉTODOS**

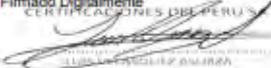
**Metales por ICP-MS:** EPA Method 6020B (Preparación de muestra: EPA Method 3051A, 2007), 2014. Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils)

**OBSERVACIONES**

Prohibida la reproducción parcial de este informe, sin la autorización escrita de CERPER S.A.  
Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de la calidad de la entidad que lo produce.

Callao, 15 de septiembre de 2023

RF

Firmado Digitalmente  
CERTIFICACIONES DEL PERU S.A.  
  
CERTIFICACIONES DEL PERU S.A.  
CALLE TENIENTE RODRIGUEZ N° 1415  
MIRAFLORES - AREQUIPA  
T. (054) 265572

**"Este informe de ensayo, al estar en el marco de la acreditación del INACAL – DA, se encuentra dentro del ámbito de reconocimiento multilateral/mutuo de los miembros firmantes de IAAC e ILAC"**

**"Este documento sin firma digital carece de validez"**

AREQUIPA  
Calle Teniente Rodríguez N° 1415  
Miraflores – Arequipa  
T. (054) 265572

CALLAO  
Oficina Principal  
Av. Santa Rosa 601, La Perla – Callao  
T. (511) 319 9000



[info@cerper.com](mailto:info@cerper.com) – [www.cerper.com](http://www.cerper.com)

" EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE"

**ANEXO N° 3**  
*IDENTIFICACIÓN MOLECULAR EN LA UNIDAD GENOMICA DE LA UNIVERSIDAD  
CAYETANO HEREDIA LIMA*

---

**INFORME DE SERVICIO**

**1. OBJETIVO:**

Identificación molecular de 04 (cuatro) muestras de cepas bacterianas.

**2. DETALLES DE LAS MUESTRAS:**

Tipo de muestras: muestras aisladas de cepas bacterianas.

Número de muestras: 04 (cuatro)

Características de las muestras: 04 placas conteniendo los aislados de cepas bacterianas en medio de cultivo sólido [agar nutritivo].

**3. METODOLOGÍA:**

**a. Recepción de muestras:**

Se recogerán las muestras de cepas bacterianas y serán llevadas al Laboratorio de la Unidad de Genómica, e inmediatamente se realizará la extracción de ADN a partir de los cultivos.

**b. Extracción de ADN a partir de los cultivos:**

Se realizará la extracción de ADN a partir de las cepas bacterianas proporcionadas, para ello se utilizará el kit comercial: Quick-DNA Fungal/Bacterial Kit de la marca: ZYMO RESEARCH. Siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (**Anexo II**)

**c. Cuantificación y visualización de las muestras de ADN:**

Para determinar la pureza y la concentración de ADN extraído a partir de las muestras, se utilizará un Biofotómetro D30 de Eppendorf®, el cual es un espectrofotómetro de amplio rango de longitud de onda. Se considerará la concentración de las muestras en ng/μL y para el nivel de pureza se determinará la relación de absorbancias 260/280, la cual se espera sea superior a 1.8. Asimismo, para determinar la calidad de las muestras de ADN, se realizará una corrida de electroforesis. Dicha corrida, se hará con la finalidad de visualizar y determinar la integridad o fragmentación del ADN, ya que se espera un buen ADN para su posterior amplificación por PCR.

**d. Amplificación de marcador ADNr 16S mediante PCR:**

Se realizará la amplificación de ADNr 16S mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para lo cual se considerará los primers universales: 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'.

Las muestras de ADN una vez extraídas, serán amplificadas según el siguiente esquema estandarizado por el Laboratorio.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen inicial (1 Reacción)
NFW			24.6 uL
Buffer	5 X	1 X	10 uL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5 mM	5 uL
dNTPs	10 mM	0.4 mM	2 uL
Forward (27F)	10 uM	0.4 uM	2 uL
Reverse (1492R)	10 uM	0.4 uM	2 uL
DNA Polimerasa	5 U/uL	2 U	0.4 uL
DNA	50 ng/uL	4 ng/uL	4 uL
Volumen Final			50 uL

Todos los ensayos de PCR serán realizados en un termociclador Mastercycler® Pro de Eppendorf®, con el siguiente programa:

Pasos	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Pre-Desnaturalización	1	94°C	4 minutos
Desnaturalización	30	94°C	1 minuto
Hibridación		57°C	1 minuto
Elongación		72°C	1 minuto
Elongación Final	1	72°C	7 minutos
Conservación	1	15°C	Indefinido

Finalmente, los productos de PCR serán visualizados en geles de agarosa al 2% en TAE 1X a través de una corrida de electroforesis a 90V por 1 hora. Se utilizará como marcador de peso molecular GeneRuler 100bp DNA Ladder de ThermoFisher Scientific™. Y serán fotografiados mediante el fotodocumentador.

**e. Secuenciamiento y análisis bioinformático:**

Las muestras amplificadas serán purificadas mediante un kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega®, siguiendo el protocolo del fabricante (**Anexo II**). Una vez

resuspendidas las muestras, estas serán enviadas a Macrogen Chile, para el servicio de secuenciamiento.

Cada una de las muestras serán secuenciadas en ambos sentidos, tanto forward como reverse. Los electroferogramas y las secuencias serán analizadas mediante ClustalX para obtener secuencias consenso. La especificidad y la identificación de las secuencias se comprobará por comparación con secuencias del Genebank, mediante un algoritmo de BLASTn.

Finalmente, las secuencias consenso serán utilizadas para realizar un análisis filogenético entre las muestras identificadas, para observar distancias genéticas entre ellas y otras muestras similares (obtenidas desde la base de datos del Genebank). La construcción de los árboles en base a las distancias genéticas se realizará con ayuda del programa MEGA y será inferido de acuerdo a un método UPGMA.

#### 4. RESULTADOS

##### a. Recepción de muestras de ADN:

Las muestras de cepas bacterianas fueron recogidas y almacenadas en el Laboratorio de la Unidad de Genómica, para su registro y su posterior almacenamiento.



Figura 01: placas con las muestras de cepas bacterianas

##### b. Evaluación de la calidad de ADN:

Se realizó la extracción de ADN de las 4 muestras enviadas (0001, 0002, 0005, y 0012), y adicionalmente se realizó la extracción de ADN a partir de controles positivos (*E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Pseudomonas spp.*). Para poder hacer la evaluación de la calidad de las muestras de ADN se realizó una electroforesis para visualizar posibles problemas de degradación del ADN, que puedan interferir con la posterior PCR.

Todas las otras muestras (0001, 0002, 0005 y 0012) mostraron ADN altamente concentrado y purificado, sin muestras de degradación o fragmentación (ver Figura 02), que permitirá los siguientes ensayos de dilución y PCR.

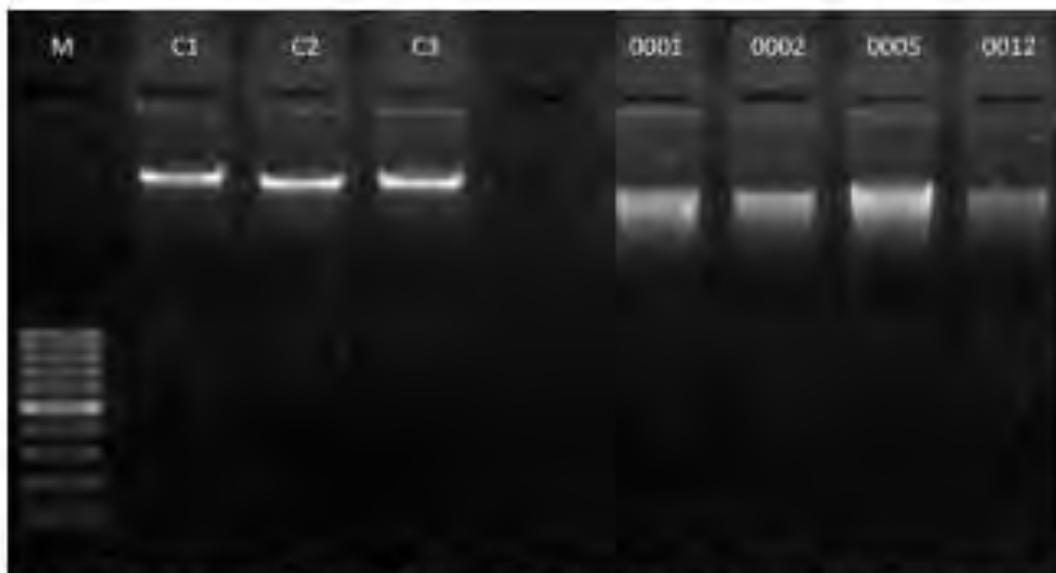


Figura 02: Geles de electroforesis mostrando la calidad de las 4 muestras de ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 1%: Se observan muestras de ADN sin degradación. Las muestras C1, C2 y C3 son controles positivos de *E. coli*, *Klebsiella sp.* y *Pseudomonas sp.*; respectivamente. Se muestra también como marcador M: 100bp.

**c. Cuantificación de las muestras de ADN:**

Una vez evaluado la calidad de las muestras de ADN, se midió la concentración de las muestras. Para ello se utilizó un Biofotómetro D30 de Eppendorf®, también se evaluó la proporción A260/A280 para poder estimar la pureza del ADN (Tabla 1). Finalmente, las muestras diluidas fueron almacenadas a 4°C para poder realizar las pruebas siguientes.

**Tabla 1.** Medidas de la concentración de ADN y pureza de las muestras:

Muestra	Concentración (ng/ul)	Pureza (A260/A280)
0001	75.6	1.85
0002	50.0	1.81
0005	48.6	1.80
0012	78.6	1.95

**d. Amplificación del marcador ADNr 16S:**

Se lograron amplificar, exitosamente, las 04 muestras y se pudo observar una banda única y viene definida (~1500bp) para todas las muestras. De igual manera que para el ADN, los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, 90V por 1 hora. (Figura 03)



Figura 03: Ejemplo de Gel de Electroforesis mostrando los productos de ADNr 16S amplificados por PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%: Se observan productos de PCR de ADNr 16S (~1500bp). Las muestras C1, C2 y C3 son controles positivos de *E. coli*, *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas* sp.; respectivamente. Un control negativo (C-). Y como marcador se utilizó 100bp Ladder (M)

e. **Análisis bioinformático de identificación y análisis filogenético:**

Todos los electroferogramas mostraron secuenciación exitosa sin problemas entre las 04 muestras. Las secuencias consenso fueron determinadas con ayuda del programa on-line Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/dispacher/msa/clustalo>), utilizando los dos secuenciamientos de cada muestra (Forward y Reverse).

Luego, se utilizó el algoritmo de BLASTn para poder buscar la identidad de las secuencias consenso por comparación con la base de datos del Genbank y los resultados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 2.** Tabla con la identificación de las muestras de cepas bacterianas

Muestra	Nombre Científico	Porcentaje de Cobertura	E-Value	Porcentaje de Identidad	Longitud Secuencia (bp)
0001	<i>Bacillus thuringiensis</i>	94%	0.0	98.95%	~1500
0002	<i>Bacillus cereus</i>	88%	0.0	94.27%	~1500
0005	<i>Bacillus mycoides</i>	95%	0.0	100.00%	~1500
0012	<i>Bacillus thuringiensis</i>	93%	0.0	98.39%	~1500

Finalmente, las secuencias consenso fueron transcritas a un archivo en formato .FASTA.

Adicionalmente, se agregaron al mismo archivo 10 secuencias distintas del género *Bacillus* y 3 secuencias más correspondientes a *E. coli*, *K. Pneumoniae* y *P. aeruginosa*; como outgroups. Este nuevo archivo generado se usó en el programa MEGA para construir los árboles filogenéticos teniendo en cuenta las distancias genéticas entre las muestras y basado en un método UPGMA (Figura 04).

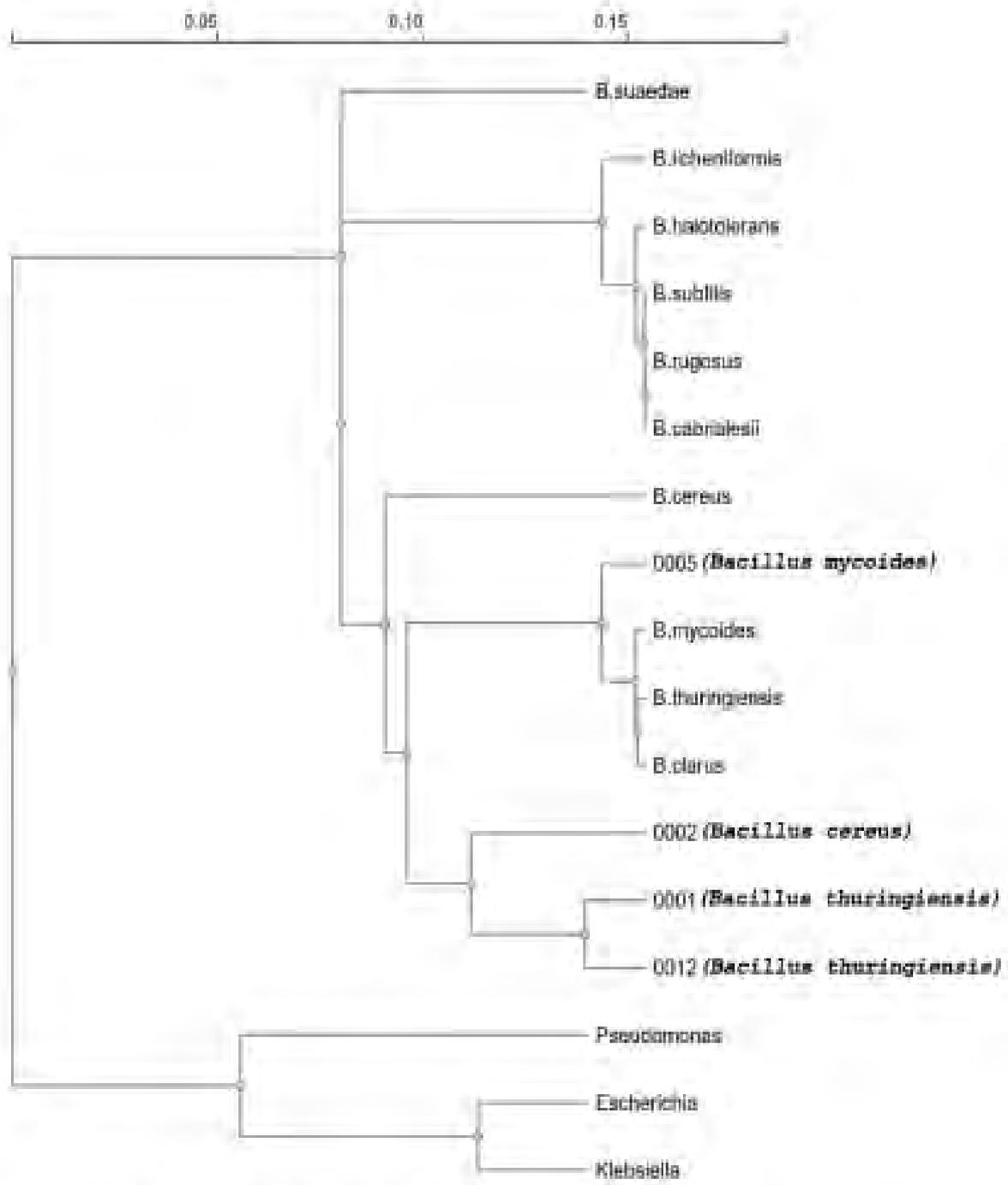


Figura 04. Análisis Filogenético de las muestras con respecto a las secuencias del género *Bacillus*.

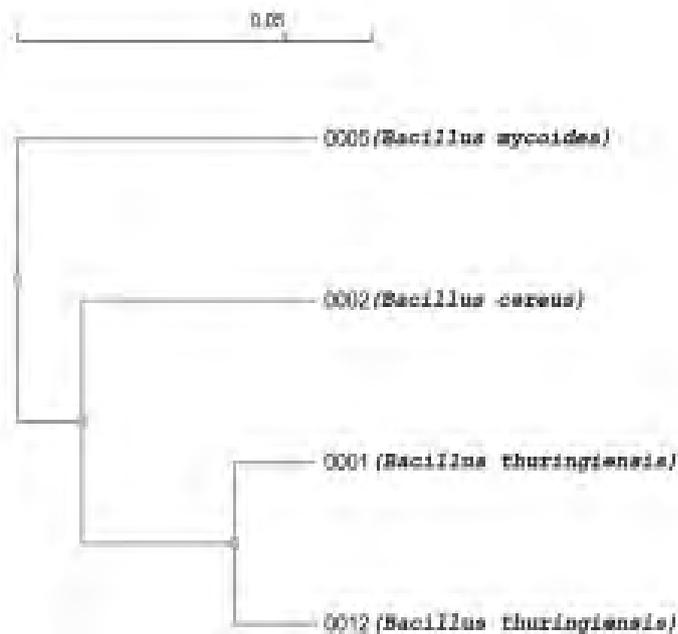


Figura 05. Análisis filogenético entre las muestras identificadas

## 5. CONCLUSIONES

- Las muestras 0001, 0002, 0005 y 0013; mostraron una calidad de ADN óptimo e idóneo para la PCR con el marcador moleculares ADNr 16S.
- Se logró amplificar el marcador 16S en las 04 muestras, teniendo bandas definidas y bien intensas.
- Se logró identificar las 4 muestras pertenecientes al género *Bacillus*. Las muestras 0001 y 0013 fueron identificadas como la especie *Bacillus thuringiensis*. La muestra 0002 fue identificada como la especie *Bacillus cereus*. Finalmente, la muestra 0005 fue identificada como la especie *Bacillus mycoides*.
- Todas las muestras obtuvieron un porcentaje de identidad bastante alto por encima del 94%.

## Protocol

For optimal performance, add beta-mercaptoethanol (user supplied) to the **Genomic Lysis Buffer** to a final dilution of 0.5 % (v/v) i.e., 500 µl per 100 ml.

1. Add 50 – 100 mg (wet weight) fungal or bacterial cells<sup>1</sup> that have been resuspended in up to 200 µl of water or isotonic buffer (e.g., PBS) to a **ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 mm & 0.5 mm)**. Add 750 µl **BashingBead™ Buffer** to the tube<sup>2</sup>.

2. Secure in a bead beater fitted with a 2 ml tube holder assembly and process at maximum speed for ≥ 5 minutes.

*Note: Required processing time will vary depending on the device and application and therefore should be evaluated on a case by case basis.*

*For example, processing times may be as little as 3 minutes when using high-speed cell disrupters (e.g., the portable TissueLyser™ Sample Processor, FastPrep® -24, or similar) or as long as 20 minutes when using lower speeds (e.g., Dismembrator Genie™ or standard benchtop-vortexes). See manufacturer's literature for operating information.*

3. Centrifuge the **ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 & 0.5 mm)** in a microcentrifuge at 10,000 x g for 1 minute.

4. Transfer up to 400 µl supernatant to a **Zymo-Spin™ III-F Filter** in a **Collection Tube** and centrifuge at 8,000 x g for 1 minute.

5. Add 1,200 µl of **Genomic Lysis Buffer** to the filtrate in the **Collection Tube** from Step 4.

6. Transfer 800 µl of the mixture from Step 5 to a **Zymo-Spin™ IICR Column<sup>3</sup>** in a **Collection Tube** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.

7. Discard the flow through from the **Collection Tube** and repeat Step 6.

8. Add 200 µl **DNA Pre-Wash Buffer** to the **Zymo-Spin™ IICR Column** in a **new Collection Tube** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.

9. Add 500 µl **g-DNA Wash Buffer** to the **Zymo-Spin™ IICR Column** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.

10. Transfer the **Zymo-Spin™ IICR Column** to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and add 100 µl (35 µl minimum) **DNA Elution Buffer** directly to the column matrix. Centrifuge at 10,000 x g for 30 seconds to elute the DNA.

Ultra-pure DNA is now ready for use in your experiments.

<sup>1</sup> This equates to approximately 10<sup>7</sup> bacteria or about 10<sup>7</sup> yeast cells.

<sup>2</sup> Cap tube tightly to prevent leakage.

<sup>3</sup> The **Zymo-Spin™ IICR Column** has a maximum capacity of 800 µl.

### ANEXO III: SECUENCIAS CONSENSOS

>0001 (*Bacillus thuringiensis*)

```
ACTCTGTTGTTAGGGGAAGAACAAGAGAAACAATTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAAC
CAGAAAGCCAGGGCAAATTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAAGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGT
CATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGARGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATATGGAGGAACACCAGTGGGGAAGGGGACTTTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGGCGGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCOCTGGTAGTCCACGCCGTAAACCGATGAGTGTCTAAGTGTAGAGGGTTT
CCGCCCTTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTT
ACCAGGTCCTTGACATCCTCTGAAAACCTCTAGAGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
GCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCCT
AGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACG
TCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACACCGTGTACAATGGACGGTACAAGAGCTGCAAGA
CCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA
GCGGAACGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGTGCCTTGTTCACCCACAC
CGCATCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
```

>0002 (*Bacillus cereus*)

```
TTTTTTTTTTCTTGGGGGGGGGGGGGGCTACCAGGAAAGTTTTTTTTTTAGGGGGGGGGGGTAAGGGTC
CACCCAAGGGGGGGTATCCGGGGGGGGGCTCTCTGTTTTTTTTTAATTTTTTTTTAAAAAGAGGGGGTTTTGT
TTTTATGGGGGCCCCCGTTCCCTTAATTGGGGGGGGAAACGCCCCCCCCGGGGCGGGGGGTCCCCCOCT
GGGGGGTGTGCCCCCGGGGGGATGAACCCCCCCCCCAATTTCTGGGGAGGCCCTTGGGGATTTCTOCCAA
AGGAGAAATCTGAAGGAACAACGCCGCTTGAATGATAAGGCTTTGGGTTGTAATAATCTGTTGTTGGGA
AGAACAATTGCTAGTTGAATAAGCTGCCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCAGGGCAAATTACGTG
CCAGCAGCCCGGTAATAAGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTG
GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGT
GCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGTCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGAAGTTAAC
GCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCCCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAA
ACTCTAGAGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTG
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCAC
TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAGAGCTGCCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATA
AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAAGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGTGCCTTGTTCACCCACACCGCATCCTGTTCAAACAGGAAAA
AGCGG
```

>0005 (*Bacillus mycodes*)

```
TATGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAOCCAAGGCGACGATGCGTAGCCG
ACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTOCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAACGCCCGGTGAGTGTGAAGGCTTTCCGGTCTGAAA
ACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAAATTATTGGGCGT
AAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCCGTAGAGATATGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGGGACTTTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCOCTGGTAGTCCACGCCGTAAACCGATGAGTGTCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTT
TAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACCGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTC
TTGACATCCTCTGAAAACCTCTAGAGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTT
GTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCA
TCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA
TCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAGAGCTGCAAGACCGCGAGG
```

TGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAAT  
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGGTATGTGGGG  
GGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTT

>0012 (*Bacillus thuringiensis*)

ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  
AATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA  
ACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGAGAACAATTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAAC  
CAGAAAGCCAGGGCAAATTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATAAGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTA  
TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC  
ATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
GATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGG  
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTC  
CGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA  
AGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTAC  
CAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTCTAGAGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGC  
ATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAG  
TTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  
AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACC  
GCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGC  
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCCGGTGCCTTGTTCACCACACC  
GCATCCTGTTCAAACAGGAAAAGCGGATGTTTGTGAGTGATGTCTGTACGCATGCATGCATGNNNNNNN

**CONFORMIDAD DE RESPONSABLES DEL INFORME:**

Elaborador por:



Cesar Obed Cotera Huayhua  
Investigador  
Unidad de Genómica, UPCH

Revisado por:



Lidio Edgar Neyra Valdez  
Jefe de Laboratorio  
Unidad de Genómica, UPCH

## ANEXO N° 4

### EXPERIMENTOS PARA LA ADSORCION DE Pb (II) (CAPACIDAD Y EFICIENCIA) CON CEPAS DE *Bacillus*. FRACTAL QUIMICOS E.I.R.L - CUSCO



**FRACTAL QUÍMICOS E.I.R.L.**

RUC: 2090973211 - Manuel Llanosaga 341  
Av. La Chirca (Lanzá 11) - PUEBLO - ZUF 4234009  
Email: fractal@fractalquimicos.com

www.fractalquimicos.pe

ORGANISMO REGULADOR DEL COMERCIO EXTERNO, INCORPORADO AL SISTEMA NACIONAL DE REGISTRO Y DEFENSA DEL CONSUMIDOR

### ENSAYOS Y ANÁLISIS DE BIOADSORCION DE METALES CON BACTERIAS

**SOLICITANTE** : .....

**MUESTRAS** : TESIS DE PREGRADO "BIOADSORCION DE Pb(II) POR CEPAS DE *Bacillus*"

Parte 1. Biomazas secas (anhidro) – 24. Figura 1  
(Recibidas en laboratorio el 25 de enero 2024)

CLA	CEA	CLB	CEB	CLC	CEC
CLA	CEA	CLB	CEA	CLC	CEC
CLA	CL1A	CLB	CL1B	CLC	CL1C
CLA	CL2A	CLB	CL2B	CLC	CL2C

Parte 2. Biomazas en suspensión – 07. Figura 2  
(Para isoterma se eligen 04 muestras, resultadas con negro)  
(Recibidas en laboratorio el 01 de abril 2024)

C0001	C0002	C0008	C0011
C0002	C0008	C0011	

**TIPO DE ENSAYOS** : 1. Con muestras de parte-1: determinación de capacidad de adsorción de Pb(II) a pH 4,20 y partir de soluciones de 50, 100 y 150 ppm.  
2. Con 04-muestras de parte 2: determinación de isoterma de adsorción.

**LUGAR Y FECHAS DE RECEPCION DE MUESTRAS** : FQ, 25-01-2024.  
**FECHA DE ANÁLISIS** : 04-02-2024 al 12-04-2024.  
**FECHA DE INFORME** : 12-04-2024. (07-paginas)

### INFORME DE RESULTADOS

#### Contenido:

	Pag.
1. Determinación de capacidad de adsorción de Pb(II) a pH 4,20 a partir de slus de 50, 100 y 150 ppm	3
1.1.- Procedimiento	3
1.2.- Análisis espectrofotométrico-nefelométrico de plomo (II)	3
1.3.- Resultados para soluciones de Pb(II) de 50, 100 y 150 ppm	4
2. Determinación de isoterma de bioadsorción para 04-muestras (C0001, C0002, C0008, C0011)	7
2.1.- Procedimiento	7
2.2.- Determinación de la capacidad de adsorción para muestras C0001, C0002, C0008, C0011	7
2.3.- Resultados	8
3.- Referencias	10

Lima, 12 de abril 2024.

Dr. J. Américo Cjano H.  
RCQP. Nro. 452  
FRACTAL QUIMICOS E.I.R.L.



**2.- DETERMINACIÓN DE ISOTERMAS DE BIADSORCIÓN DE Pb(II) A pH 4,20 PARA 84-SUESTRAS (C8801, C8802, C8808, C8811)**

**2.1.- Procedimiento**

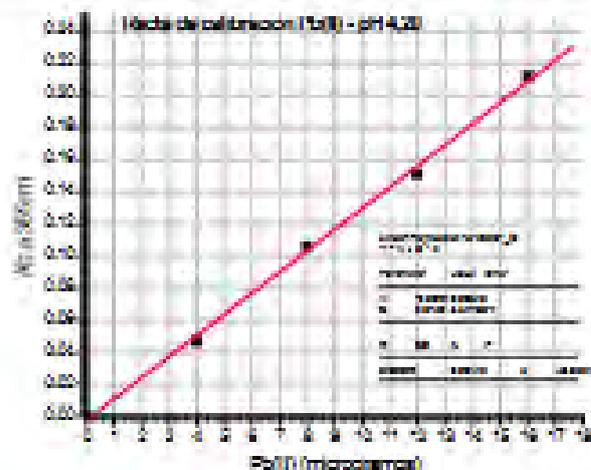
**Mostras de biomasa en suspensión (Serie C8801, C8802, C8808, C8811):**

- k. Homogeneización de la suspensión por agitación con vortex por 1-minuto
- l. Determinación de biomasa seca por evaporación a sequedad de un alícuota de 50 microlitros de muestra. Método gravimétrico (Secado en estufa a 110°C x 3 horas de alícuota de 50 microlitros. Pese en balanza analítica)
- j. Con el porcentaje de materia seca por volumen (materia seca = biomasa seca) se determina el volumen de la suspensión líquida correspondiente a 0,0100g de biomasa seca en cada muestra que se transfiere a 07 tubos de 10ml (Tubos numerados del 1 al 7). Al tubo-1 se adiciona solución de Pb(II) 0,00ppm de pH 4,20; al tubo-2 se adiciona solución de Pb(II) 70ppm de pH 4,20; ... ; tubo-7 se adiciona solución de Pb(II) 300ppm de pH 4,20. Según la tabla 6.
- k. Agitación con vortex hasta dispersión completa y reposa por 00-horas (T-ambiental 25-27°C), agitación cada 15 minutos.
- l. Centrifugación a 2500 rpm x 5minutos y decantación a vaso de 10 ml del sobrenadante.
- m. Sobrenadante decantado, filtración a tubos con membrana de Nylon (1,2mm) de 0,45 micras. Muestras preparadas para el análisis de Pb(II)-adsorbido.
- n. Preparación de la curva de calibración de Pb(II) y determinación espectrofotométrica a 355nm según la reacción:  $Pb^{2+} + S^{2-} \rightarrow PbS_{(s,precipitado)}$  [S<sup>2-</sup> como sulfuro de amonio, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S]. Según la tabla 7.

**2.2.- Análisis espectrofotométrico-nefelométrico de Pb(II) y determinación de isotermas de adsorción**

**Tabla 5. Roca de calibración y determinación nefelométrica a 355nm**

Tubo/Pb(II)	100ppm Pb (µL)   (µg)	H <sub>2</sub> O (µL)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S 485ppm <sup>100</sup> (µL)	H <sub>2</sub> O (µL)	Ab 355nm
1 - 0ppm	0   0,00	950	50	1000	0,000
2 - 3ppm	30   3,00	910	50	1000	0,047
3 - 4ppm	40   4,00	870	50	1000	0,106
4 - 6ppm	60   6,00	830	50	1000	0,151
5 - 8ppm	80   8,00	790	50	100	0,229





**1.- DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOADSORCIÓN DE Pb(II) A Pb 4,20 A PARTIR DE SOLUCIONES (50, 100 y 150 ppm)**

**1.1.- Procedimiento**

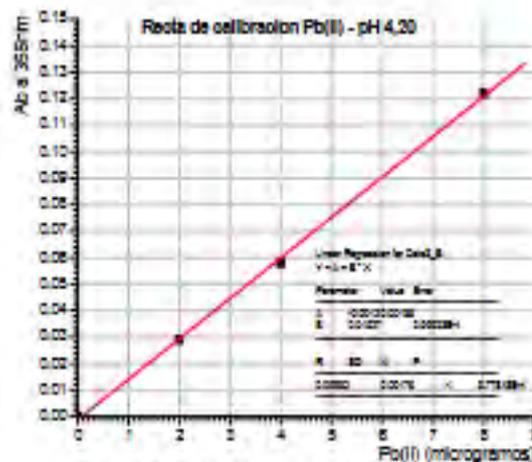
**Muestras secas de biomasa (Series C1A ... C12C):**

- Trituración y molienda en tubo con varilla de vidrio (hasta apariencia de polvo)
- Peso de 24-tubos de acric C1A ... C12C (10ml) y dentro muestras entre 0,0060 a 0,0121g ( $\pm$  0,0001) – Tabla 1.
- Sobre la muestra adicionar 2,00 ml de soluciones secacas de Pb(II) 50ppm\*, 100ppm y 150ppm pH 4,20 (\* Solución madre de Pb(II) 9250ppm disuelta en agua pH 4,20 (HCl-0,33  $\pm$  10<sup>-4</sup> Molar) a partir de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – 99,9%).
- Agitación con vortex hasta dispersión completa y reposo por 02-horas (T-ambiental 25-27°C), agitación cada 15 minutos.
- Centrifugación a 3500 rpm o 5 minutos y decantación a vasos de 10 ml del sobrenadante.
- Sobrenadante descartado, filtración a tubos con membrana de Nylon (13mm) de 0,45 micras. Muestras preparadas para el análisis de Pb(II)-adsorbido.
- Preparación de la curva de calibración de Pb(II) y determinación espectrofotométrica a 355nm según la reacción:  $Pb^{2+} + S^{2-} \rightarrow PbS_{(s,blanca)}$  [S<sup>2-</sup> como sulfuro de amonio, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S]. Según la tabla 1.

**1.2.- Análisis espectrofotométrico-reflejométrica de Pb(II) (Tabla 1)**

**Tabla 1. Recta de calibración y determinación reflejométrica a 355nm**

Tubo/Pb(II)	100ppmPb		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S		Ab	
	( $\mu$ L)	( $\mu$ g)	H <sub>2</sub> O	485ppm <sup>1-44</sup>	H <sub>2</sub> O	355nm
			( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	
1 - 0ppm	0	0,00	950	50	1000	0,000
2 - 1ppm	20	2,00	930	50	1000	0,029
3 - 2ppm	40	4,00	910	50	1000	0,058
4 - 4ppm	80	8,00	870	50	1000	0,122



**Figura 3. Recta de calibración para el análisis de Pb(II)**



**1.3.- Resultados**

**Tabla2.** Resultados A partir de solución de 50ppm Pb (II)

Muestra	Peso seco (g)	Ab355nm	[Pb]-adsorbido ppm	[Pb]-adsorbido En 2ml* (miligramos, mg)	Eficiencia de remoción% (Ci-Cf) Cx100	Promedio eficiencia de remoción %	Pb-ads/lg-biomasa (Pb-mg/lg-biomasa)	Promedio
C001A- <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,0104	0,000	50,0	0,10	99.80%	99.80%	9.61	9,61±0
C001B- <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,0100	0,000	50,0	0,10	99.80%		9.61	
C001C- <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,0105	0,000	50,0	0,10	99.80%		9.61	
C002A- <i>Bacillus cereus</i>	0,0103	0,000	50,0	0,10	99.80%	99.80%	9.61	9,61±0
C002B- <i>Bacillus cereus</i>	0,0102	0,000	50,0	0,10	99.80%		9.61	
C002C- <i>Bacillus cereus</i>	0,0102	0,000	50,0	0,10	99.80%		9.61	
C005A- <i>Bacillus mycolides</i>	0,0101	0,000	50,0	0,10	99.80%	99.80%	9.61	9,61±0
C005B- <i>Bacillus mycolides</i>	0,0103	0,000	50,0	0,10	99.80%		9.61	
C005C- <i>Bacillus mycolides</i>	0,0105	0,000	50,0	0,10	99.80%		9.61	
C012A- <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,0103	0,000	50,0	0,10	99.80%	99.80%	9.61	9,61±0
C012B- <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,0104	0,000	50,0	0,10	99.80%		9.61	
C012C- <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,0101	0,000	50,0	0,10	99.80%		9.61	



**Tabla3.** Resultados A partir de solución de 100ppm Pb (II)

Muestra	Peso seco (g)	Ab355nm	[Pb]-adsorbido CSA:(100-18,1) (ppm)	[Pb]-adsorbido En 2ml* (miligramos, mg)	Eficiencia de remoción% (Ci-Cf) Cix100	Promedio eficiencia de remoción %	Pb-ads/lg-biomasa (Pb-mg/lg-biomasa)	Promedio
C001A- <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,0116	0,033	88,8	0,178	88.80%	90.33%	15,3	17,13±1.60
C001B- <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,0102	0,027	90,8	0,182	90.80%		17,8	
C001C- <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,0100	0,025	91,4	0,183	91.40%		18,3	
C002A- <i>Bacillus cereus</i>	0,0104	0,034	88,5	0,177	88.50%	92.33%	17,0	17,63±1.27
C002B- <i>Bacillus cereus</i>	0,0089	0,009	96,7	0,193	96.70%		16,8	
C002C- <i>Bacillus cereus</i>	0,0096	0,024	91,8	0,184	91.80%		19,1	
C005A- <i>Bacillus mycoides</i>	0,0107	0,034	100-18,1 = 81,9	0,164	81.90%	76.77%	15,3	14,47±1.12
C005B- <i>Bacillus mycoides</i>	0,0107	0,061	79,6	0,159	79.60%		14,9	
C005C- <i>Bacillus mycoides</i>	0,0104	0,094	68,8	0,138	68.80%		13,2	
C012A- <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,0104	0,040	86,5	0,173	86.50%	82.80%	16,6	16,8±1.11
C012B- <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,0094	0,077	74,4	0,149	74.40%		15,8	
C012C- <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,0097	0,037	87,5	0,173	87.50%		18,0	



**Tabla 4.** Resultados A partir de solución de 150ppm Pb(II)

Muestra	Peso seco (g)	Ab355nm	[Pb]-adsorbido CSA: (150-27.6) (ppm)	[Pb]-adsorbido En 2ml* (miligramos, µg)	Eficiencia de remoción % (Ci-Cf) Cx100	Promedio	Pb-ads/lg-biomasa (Pb-mg/lg-biomasa)	
C001A-B. <i>thuringiensis</i>	0,0101	0,038	124,3	0,249	82.86%	82.86%	24,6	24±0.52
C001B-B. <i>thuringiensis</i>	0,0105	0,038	124,3	0,249	82.86%		23,7	
C001C-B. <i>thuringiensis</i>	0,0105	0,038	124,3	0,249	82.86%		23,7	
C002A-B. <i>ceruus</i>	0,0103	0,039	124,7	0,249	83.13%	83.68%	24,2	24.3±0.17
C002B-B. <i>ceruus</i>	0,0105	0,034	127,0	0,254	84.60%		24,2	
C002C-B. <i>ceruus</i>	0,0102	0,037	125,0	0,250	83.30%		24,5	
C005A-B. <i>mycoides</i>	0,0107	0,041	122,4	0,245	81.60%	82.60%	22,9	23.7±0.75
C005B-B. <i>mycoides</i>	0,0103	0,036	125,6	0,251	83.73%		24,4	
C005C-B. <i>mycoides</i>	0,0104	0,039	123,7	0,247	82.46%		23,8	
C012A-B. <i>thuringiensis</i>	0,0104	0,039	123,7	0,247	82.46%	82.44%	23,8	23.57±0.32
C012B-B. <i>thuringiensis</i>	0,0106	0,040	123,0	0,246	82.00%		23,2	
C012C-B. <i>thuringiensis</i>	0,0105	0,038	124,3	0,249	82.86%		23,7	

## 2.2.- Resultados

### C0001

[C-ppm] [mgPb/1g-biomasa-seca]

0	0
75	21.3
100	24.9
150	28.3
200	28.9
250	30.3
300	30.1

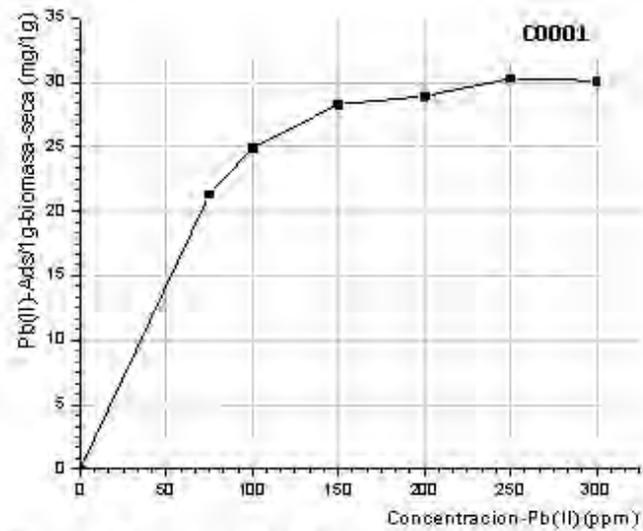


Figura 5. Isoterma de adsorción – C0001

### C0002

[C-ppm] [mgPb/1g-biomasa-seca]

0	0
75	17.6
100	22.5
150	28.4
200	31.3
250	31.8
300	32.0

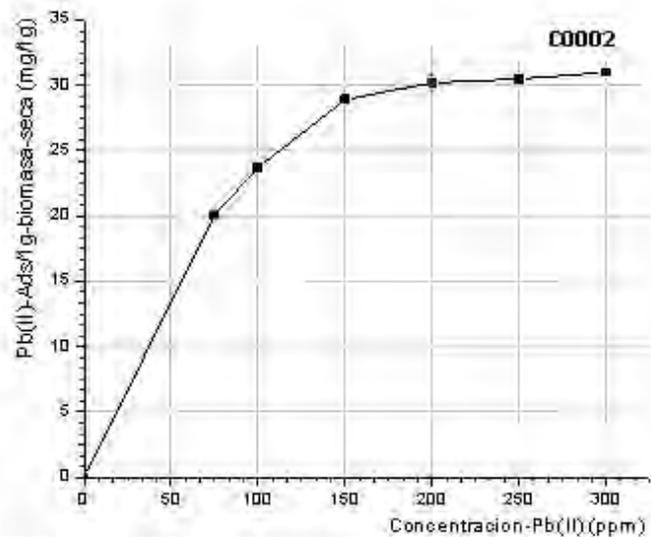


Figura 6. Isoterma de adsorción – C0002

<b>C0005</b>	
<b>[C-ppm]</b>	<b>[mgPb/1g-biomasa-seca]</b>
0	0
75	20.1
100	23.7
150	28.9
200	30.2
250	30.5
300	31.0

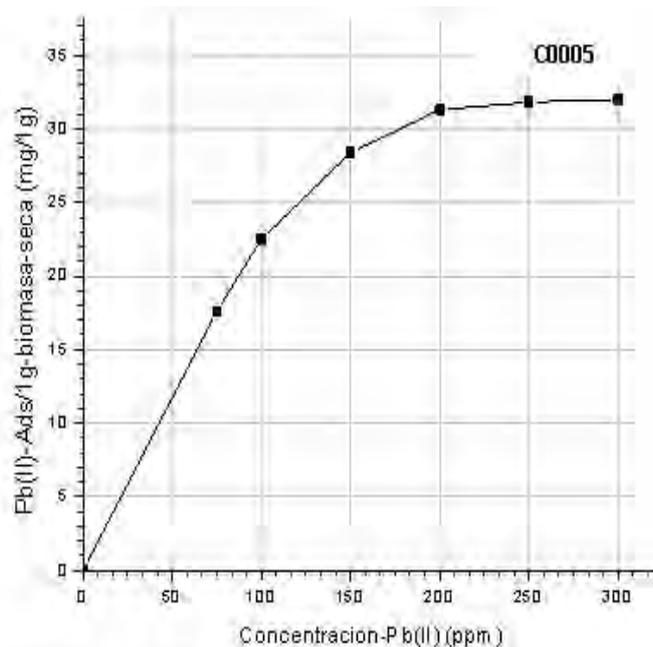


Figura 7. Isoterma de adsorción – C0005

<b>C0012</b>	
<b>[C-ppm]</b>	<b>[mgPb/1g-biomasa-seca]</b>
0	0
75	19.7
100	23.7
150	27.8
200	30.4
250	30.3
300	30.5

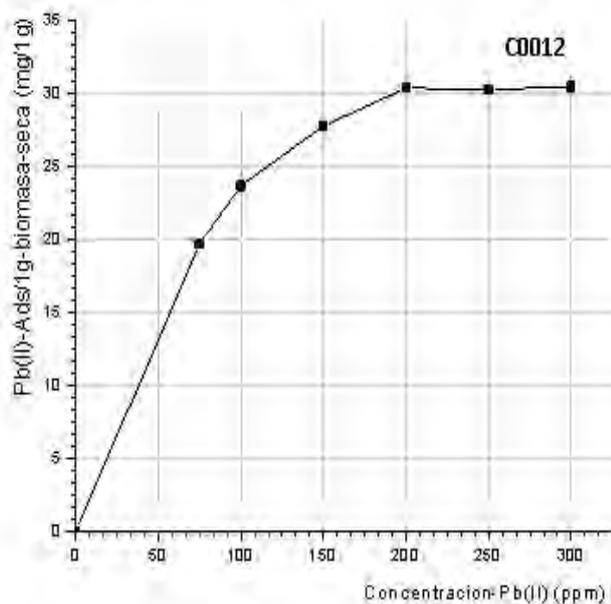


Figura 8. Isoterma de adsorción – C0012

**ANEXO N° 5**  
**DECRETO SUPREMO N°011-2017-MINAM**

**ANEXO**  
**ESTÁNDARES DE CALIDAD AMBIENTAL (ECA) PARA SUELO**

Parámetros en mg/kg P <sub>so</sub>	Usos del Suelo <sup>(1)</sup>			Métodos de ensayo <sup>(1)(2)</sup>
	Suelo Agrícola <sup>(2)</sup>	Suelo Residencial/ Parques <sup>(3)</sup>	Suelo Comercial/ Industrial/ Extractivo <sup>(4)</sup>	
<b>ORGÁNICOS</b>				
<b>Hidrocarburos aromáticos volátiles</b>				
Benceno	0,03	0,03	0,03	EPA 8260 <sup>(5)</sup> EPA 8021
Tolueno	0,37	0,37	0,37	EPA 8260 EPA 8021
Etilbenceno	0,062	0,062	0,062	EPA 8260 EPA 8021
Xileno <sup>(6)</sup>	11	11	11	EPA 8260 EPA 8021
<b>Hidrocarburos policíclicos</b>				
Naftaleno	0,1	0,6	22	EPA 8260 EPA 8021 EPA 8270
Benz(a)pireno	0,1	0,7	0,7	EPA 8270
<b>Hidrocarburos de Petróleo</b>				
Fración de hidrocarburos F1 <sup>(7)</sup> (C6-C10)	300	300	500	EPA 8015
Fración de hidrocarburos F2 <sup>(8)</sup> (>C10-C28)	1200	1200	5000	EPA 8015
Fración de hidrocarburos F3 <sup>(9)</sup> (>C28-C40)	3000	3000	6000	EPA 8015
<b>Compuestos Organoclorados</b>				
Bifenilos policlorados - PCB <sup>(10)</sup>	0,5	1,3	33	EPA 8082 EPA 8270
Tetraclorotileno	0,1	0,2	0,6	EPA 8260
Triclorotileno	0,01	0,01	0,01	EPA 8260
<b>INORGÁNICOS</b>				
Arsénico	50	50	140	EPA 3050 EPA 3051
Cadmio total <sup>(11)</sup>	750	600	2.000	EPA 3050 EPA 3051
Cadmio	1,4	10	22	EPA 3050 EPA 3051
Cromo total	**	400	1.000	EPA 3050 EPA 3051
Cromo (VI)	0,4	0,4	1,4	EPA 3050 EPA 7158 c QM EN 15132 <sup>(12)</sup>
Mercurio	5,6	5,6	24	EPA 7471 EPA 6020 a 203.8
Plomo	70	140	100	EPA 3050 EPA 3051
Plomo Libre	0,9	0,9	9	EPA 8013 SENIWM-AWIMA-REF 4500/EN F o ASTM D723 <sup>(13)</sup> y/o ISO 17550:2015.

**Categoría 1: Poblacional y Recreacional**

**Subcategoría A: Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable**

Parámetros	Unidad de medida	A1	A2	A3
		Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección	Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional	Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento avanzado
<b>FÍSICOS- QUÍMICOS</b>				
Aceites y Grasas	mg/L	0.0	1.7	1.7
Cianuro Total	mg/L	0.07	**	**
Cianuro Libre	mg/L	**	0.2	0.2
Cloruro	mg/L	250	270	250
Color (pc)	Color verdadero Escala PCCo	10	100 (pc)	**
Conductividad	(µS/cm)	1 500	1 600	**
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO <sub>5</sub> )	mg/L	3	5	10
Dureza	mg/L	500	**	**
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg/L	10	20	30
Fenoles	mg/L	0.003	**	**
Fluoruro	mg/L	1.0	**	**
Fosforo Total	mg/L	0.1	0.15	0.10
Materiales Flotantes de Origen Antropogénico		Ausencia de material flotante de origen antropico	Ausencia de material flotante de origen antropico	Ausencia de material flotante de origen antropico
Nitrato (NO <sub>3</sub> -N) (pc)	mg/L	50	50	50
Nitrito (NO <sub>2</sub> -N) (pc)	mg/L	3	3	**
Amoníaco-N	mg/L	1.0	1.5	**
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	≥ 6	≥ 5	≥ 4
Potencial de Hidrogeno (pH)	Unidad de pH	6.5 – 8.5	6.5 – 9.0	6.5 – 9.0
Sólidos Disueltos Totales	mg/L	1 000	1 000	1 000
Sulfato	mg/L	250	600	**
Temperatura	°C	≤ 3	≤ 3	**
Turbiedad	UNT	5	100	**
<b>INORGÁNICOS</b>				
Aluminio	mg/L	0.3	5	5
Antimonio	mg/L	0.02	0.02	**
Arsénico	mg/L	0.01	0.01	0.03
Bario	mg/L	0.7	1	**
Berilio	mg/L	0.012	0.04	0.1
Boro	mg/L	2.4	2.4	2.4
Cadmio	mg/L	0.003	0.005	0.01
Cobalto	mg/L	2	2	2
Cromo Total	mg/L	0.05	0.05	0.05
Hierro	mg/L	0.3	1	5
Manganeso	mg/L	0.4	0.4	0.5
Mercurio	mg/L	0.001	0.002	0.002
Níquel	mg/L	0.07	**	**

Parametros	Unidad de medida	A1	A2	A3
		Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección	Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional	Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento avanzado
Níquel	mg/L	0,07	**	**
Plata	mg/L	0,01	0,05	0,05
Selenio	mg/L	0,04	0,04	0,05
Urano	mg/L	0,02	0,02	0,02
Zinc	mg/L	3	5	5
<b>ORGÁNICOS</b>				
Hidrocarburos Totales de Petróleo (C <sub>1</sub> - C <sub>10</sub> )	mg/L	0,01	0,2	1,0
Trihalometanos	( $\Sigma$ )	1,0	1,0	1,0
Bromoformo	mg/L	0,1	**	**
Cloroformo	mg/L	0,3	**	**
Dibromodlorometano	mg/L	0,1	**	**
Bromodlorometano	mg/L	0,05	**	**
<b>I. COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES</b>				
1,1,1-Tricloroetano	mg/L	0,2	0,2	**
1,1-Dicloroetano	mg/L	0,03	**	**
1,2-Dicloroetano	mg/L	0,03	0,03	**
1,2-Diclorobenceno	mg/L	1	**	**
Hexaclorobutadieno	mg/L	0,0006	0,0006	**
Tetracloroetano	mg/L	0,04	**	**
Tetracloro de carbono	mg/L	0,004	0,004	**
Tricloroetano	mg/L	0,07	0,07	**
<b>BTEX</b>				
Benceno	mg/L	0,01	0,01	**
Etilbenceno	mg/L	0,3	0,3	**
Tolueno	mg/L	0,7	0,7	**
Xilenos	mg/L	0,5	0,5	**
<b>Hidrocarburos Aromáticos</b>				
Benc(a)pireno	mg/L	0,0007	0,0007	**
Perclorofenil (PCP)	mg/L	0,009	0,009	**
<b>Organofosforados</b>				
Malatión	mg/L	0,19	0,0001	**
<b>Organoclorados</b>				
Aldrin + Dieldrin	mg/L	0,00003	0,00003	**
Clordano	mg/L	0,0002	0,0002	**
Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT)	mg/L	0,001	0,001	**
Endrin	mg/L	0,0006	0,0006	**
Heptacloro + Heptacloro Epóxido	mg/L	0,00003	0,00003	**
Lindano	mg/L	0,002	0,002	**
<b>Carbamato</b>				
Aldicarb	mg/L	0,01	0,01	**
<b>II. CIANOTOXINAS</b>				
Microcistina LR	mg/L	0,001	0,001	**
<b>III. BIFENILOS POLICLORADOS</b>				
Bifenilos Policlorados (PCB)	mg/L	0,0005	0,0005	**
<b>MICROBIOLÓGICOS Y PARASITOLÓGICOS</b>				
Cóloformes Totales	NMP/100 ml	50	**	**
Cóloformes Termotolerantes	NMP/100 ml	20	2 000	20 000
Formas Parasitarias	N° Organismos/L	0	**	**
Escherichia coli	NMP/100 ml	0	**	**
Vibrio cholerae	Presencia/100 ml	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Organismos de vida libre (algas, protozoos, copepodos, rotíferos, nematodos, en todos sus estados evolutivos) (f)	N° Organismos/L	0	<5x10 <sup>6</sup>	<5x10 <sup>6</sup>

**Subcategoría B: Aguas superficiales destinadas para recreación**

Parámetros	Unidad de medida	B1	B2
		Contacto primario	Contacto secundario
<b>FISICOS- QUÍMICOS</b>			
Aceites y Grasas	mg/L	Ausencia de película visible	**
Cianuro Libre	mg/L	0,022	0,022
Cianuro Wad	mg/L	0,08	**
Color	Color verdadero Escala Pt/Co	Sin cambio normal	Sin cambio normal
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO <sub>5</sub> )	mg/L	5	10
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg/L	30	50
Detergentes (SAAM)	mg/L	0,5	Ausencia de espuma persistente
Materiales Flotantes de Origen Antropogénico		Ausencia de material flotante	Ausencia de material flotante
Nitratos (NO <sub>3</sub> -N)	mg/L	10	**
Nitritos (NO <sub>2</sub> -N)	mg/L	1	**
Olor	Factor de dilución a 25° C	Aceptable	**
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	≥ 5	≥ 4
Potencial de Hidrógeno (pH)	Unidad de pH	6,0 a 9,0	**
Sulfuros	mg/L	0,05	**
Turbiedad	UNT	100	**
<b>INORGÁNICOS</b>			
Aluminio	mg/L	0,2	**
Antimonio	mg/L	0,006	**
Arsénico	mg/L	0,01	**
Bario	mg/L	0,7	**

Parámetros	Unidad de medida	B1	B2
		Contacto primario	Contacto secundario
Berilio	mg/L	0,04	**
Boro	mg/L	0,5	**
Cadmio	mg/L	0,01	**
Cobre	mg/L	2	**
Cromo Total	mg/L	0,05	**
Cromo VI	mg/L	0,05	**
Hierro	mg/L	0,3	**
Manganeso	mg/L	0,1	**
Mercurio	mg/L	0,001	**
Níquel	mg/L	0,02	**
Plata	mg/L	0,01	0,05
Plomo	mg/L	0,01	**
Selenio	mg/L	0,01	**
Uranio	mg/L	0,02	0,02
Vanadio	mg/L	0,1	0,1
Zinc	mg/L	3	**
<b>MICROBIOLÓGICOS Y PARASITOLÓGICO</b>			
Coliformes Termotolerantes	NMP/100 ml	200	1 000
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100 ml	Ausencia	Ausencia
Formas Parasitarias	N° Organismo/L	0	**
<i>Giardia duodenalis</i>	N° Organismo/L	Ausencia	Ausencia
Enterococos intestinales	NMP/100 ml	200	**
<i>Salmonella spp</i>	Presencia/100 ml	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	Presencia/100 ml	Ausencia	Ausencia

**Nota 2:**

- UNT: Unidad Nefelométrica de Turbiedad.
- NMP/100 ml: Número más probable en 100 ml.
- El símbolo \*\* dentro de la tabla significa que el parámetro no aplica para esta Subcategoría.
- Los valores de los parámetros se encuentran en concentraciones totales, salvo que se indique lo contrario.

**Categoría 2: Extracción, cultivo y otras actividades marino costeras y continentales**

Parámetros	Unidad de medida	C1	C2	C3	C4
		Extracción y cultivo de moluscos, equidermos y tunicados en aguas marino costeras	Extracción y cultivo de otras especies hidrobiológicas en aguas marino costeras	Actividades marino portuarias, industriales o de saneamiento en aguas marino costeras	Extracción y cultivo de especies hidrobiológicas en lagos o lagunas
<b>FISICOS- QUÍMICOS</b>					
Aceites y Grasas	mg/L	1,0	1,0	2,0	1,0
Cianuro Wad	mg/L	0,004	0,004	**	0,0052
Color (después de filtración simple) (b)	Color verdadero Escala P/Co	100 (a)	100 (a)	**	100 (a)
Materiales Flotantes de Origen Antropogénico		Ausencia de material flotante	Ausencia de material flotante	Ausencia de material flotante	Ausencia de material flotante
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO <sub>5</sub> )	mg/L	**	10	10	10
Fósforo Total	mg/L	0,062	0,062	**	0,025
Nitratos (NO <sub>3</sub> ) (c)	mg/L	16	16	**	13
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	≥ 4	≥ 3	≥ 2,5	≥ 5
Potencial de Hidrógeno (pH)	Unidad de pH	7 – 8,5	6,8 – 8,5	6,8 – 8,5	6,0-9,0
Sólidos Suspendidos Totales	mg/L	80	80	70	**
Sulfuros	mg/L	0,05	0,05	0,05	0,05
Temperatura	°C	Δ 3	Δ 3	Δ 3	Δ 3
<b>INORGÁNICOS</b>					
Amoníaco Total (NH <sub>3</sub> )	mg/L	**	**	**	(1)
Antimonio	mg/L	0,64	0,64	0,64	**
Arsénico	mg/L	0,05	0,05	0,05	0,1
Boro	mg/L	5	5	**	0,75
Cadmio	mg/L	0,01	0,01	**	0,01
Cobre	mg/L	0,0031	0,05	0,05	0,2
Cromo VI	mg/L	0,05	0,05	0,05	0,10
Mercurio	mg/L	0,00094	0,0001	0,0018	0,00077
Níquel	mg/L	0,0082	0,1	0,074	0,052
Plomo	mg/L	0,0081	0,0081	0,03	0,0025
Selenio	mg/L	0,071	0,071	**	0,005
Talio	mg/L	**	**	**	0,0006
Zinc	mg/L	0,081	0,081	0,12	1,0
<b>ORGÁNICO</b>					
Hidrocarburos Totales de Petróleo (fracción aromática)	mg/L	0,007	0,007	0,01	**
<b>Bifenilos Policlorados</b>					
Bifenilos Policlorados (PCB)	mg/L	0,00003	0,00003	0,00003	0,000014
<b>ORGANOLEPTICO</b>					
Hidrocarburos de Petróleo	mg/L	No visible	No visible	No visible	**
<b>MICROBIOLÓGICO</b>					
Coliformes Termotolerantes	NMP/100 ml	≤ 14 (área aprobada) (a)	≤ 30	1 000	200
	NMP/100 ml	≤ 88 (área restringida) (d)			

### Categoría 3: Riego de vegetales y bebida de animales

Parámetros	Unidad de medida	D1: Riego de vegetales		D2: Bebida de animales
		Agua para riego no restringido (c)	Agua para riego restringido	Bebida de animales
<b>FISICOS- QUIMICOS</b>				
Aceites y Grasas	mg/L	5		10
Bicarbonatos	mg/L	518		**
Cianuro Wad	mg/L	0,1		0,1
Cloruros	mg/L	500		**
Color (b)	Color verdadero Escala Pt/Co	100 (a)		100 (a)
Conductividad	( $\mu$ S/cm)	2 500		5 000
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO <sub>5</sub> )	mg/L	15		15
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg/L	40		40
Detergentes (SAAM)	mg/L	0,2		0,5
Fenoles	mg/L	0,002		0,01
Fluoruros	mg/L	1		**
Nitratos (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N) + Nitritos (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N)	mg/L	100		100
Nitritos (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N)	mg/L	10		10
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	≥ 4		≥ 5
Potencial de Hidrógeno (pH)	Unidad de pH	6,5 – 8,5		6,5 – 8,4
Sulfatos	mg/L	1 000		1 000
Temperatura	°C	Δ 3		Δ 3
<b>INORGÁNICOS</b>				
Aluminio	mg/L	5		5

Parámetros	Unidad de medida	D1: Riego de vegetales		D2: Bebida de animales
		Agua para riego no restringido (c)	Agua para riego restringido	Bebida de animales
Ársenico	mg/L	0,1		0,2
Bario	mg/L	0,7		**
Berio	mg/L	0,1		0,1
Boro	mg/L	1		5
Cadmio	mg/L	0,01		0,05
Cobre	mg/L	0,2		0,5
Cobalto	mg/L	0,05		1
Cromo Total	mg/L	0,1		1
Hierro	mg/L	5		**
Litio	mg/L	2,5		2,5
Magnesio	mg/L	**		250
Manganeso	mg/L	0,2		0,2
Mercurio	mg/L	0,001		0,01
Níquel	mg/L	0,2		1
Plomo	mg/L	0,05		0,05
Selenio	mg/L	0,02		0,05
Zinc	mg/L	2		24
<b>ORGÁNICO</b>				
<b>Bifenilos Policlorados</b>				
Bifenilos Policlorados (PCB)	µg/L	0,04		0,045
<b>PLAGUICIDAS</b>				
Peratión	µg/L	35		35
<b>Organoclorados</b>				
Aldrin	µg/L	0,004		0,7
Clordano	µg/L	0,006		7
Dicloro Difetil Tricloroetano (DDT)	µg/L	0,001		30
Dieldrin	µg/L	0,5		0,5
Endosulfán	µg/L	0,01		0,01
Endrin	µg/L	0,004		0,2
Heptacloro y Heptacloro Epóxido	µg/L	0,01		0,03
Lindano	µg/L	4		4
<b>Carbamato</b>				
Aldicarb	µg/L	1		11
<b>MICROBIOLÓGICOS Y PARASITOLÓGICO</b>				
Coliformes Termotolerantes	NMP/100 ml	1 000	2 000	1 000
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100 ml	1 000	**	**
Huevos de Helminfos	Huevo/L	1	1	**

Categoría 4: Conservación del ambiente acuático

Parámetros	Unidad de medida	E1: Lagunas y lagos	E2: Riso		E3: Ecosistemas costeros y marinos	
			Costa y sierra	Selva	Estuarios	Marino
<b>RISICOS QUÍMICOS</b>						
Acidos y Grasas (MEH)	mg/L	≤ 0	5,0	5,0	5,0	5,0
Cloruro Libre	mg/L	0,0002	0,0002	0,0002	0,001	0,001
Color (u)	Color verdadero Escala PVCc	20 (u)	20 (u)	20 (u)	**	**
Corona A	mg/L	0,008	**	**	**	**
Conductividad	(µS/cm)	1,000	1,000	1,000	**	**
Difusión Biológica de Oxígeno (DBO <sub>5</sub> )	mg/L	0	10	10	15	10
Fosfatos	mg/L	2,50	2,50	2,00	0,5	0,5
Fosforato	mg/L	0,020	0,05	0,05	0,024	0,062
Nitrato (NO <sub>3</sub> -N)	mg/L	15	15	15	200	200
Amoníaco Total (NH <sub>3</sub> -N)	mg/L	11	11	11	20	12
Nitrógeno Total	mg/L	0,318	**	**	**	**
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	≥ 8	≥ 5	≥ 5	≥ 4	≥ 4
Potencial de hidrogeno (pH)	Unidad de pH	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,8 - 8,5	6,6 - 8,0
Sólidos Suspendedos Totales	mg/L	≤ 25	≤ 100	≤ 400	≤ 100	≤ 30
Sulfatos	mg/L	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Temperatura	°C	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 2	≤ 2
<b>INORGÁNICOS</b>						
Antimonio	mg/L	0,04	0,04	0,04	**	**
Arsenico	mg/L	0,15	0,15	0,15	0,036	0,036
Bario	mg/L	0,7	0,7	1	1	**
Cadmio Disuelto	mg/L	0,00025	0,00025	0,00025	0,0003	0,0006
Cobre	mg/L	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05
Cromo VI	mg/L	0,011	0,011	0,011	0,05	0,05
Mercurio	mg/L	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Níquel	mg/L	0,052	0,052	0,052	0,0062	0,0062
Plomo	mg/L	0,0025	0,0025	0,0025	0,0051	0,0051
Selenio	mg/L	0,005	0,006	0,005	0,071	0,071
Talio	mg/L	0,0008	0,0008	0,0008	**	**
Zinc	mg/L	0,12	0,12	0,12	0,031	0,031
<b>ORGÁNICOS</b>						
<b>Compuestos Orgánicos Volátiles</b>						
Hidrocarburos Totales de Petróleo	mg/L	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5
Hexafluorobenceno	mg/L	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006	0,0016
<b>BTEX</b>						
Benceno	mg/L	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
<b>Hidrocarburos Aromáticos</b>						
Benz(a)Pireno	mg/L	0,0001	0,0001	0,0011	0,0001	0,0001
Acenapteno	mg/L	0,0004	0,0004	0,0014	0,0004	0,0004
Fluoranteno	mg/L	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
<b>Efectos Poliorados</b>						
Bifenilos Policlorados (PCB)	mg/L	0,00004	0,00004	0,00004	0,00003	0,00003
<b>PLAGUICIDAS</b>						
<b>Organofosforados</b>						
Malatión	mg/L	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Paratión	mg/L	0,000013	0,000013	0,000012	**	**
<b>Organoclorados</b>						
Aldrin	mg/L	0,000004	0,000004	0,000004	**	**
Dieldrin	mg/L	0,0000043	0,0000043	0,0000043	0,000004	0,000004
DDT (Suma de 4,4-DDD y 4,4-DDE)	mg/L	0,000001	0,000001	0,000001	0,000001	0,000001
Dielsin	mg/L	0,000006	0,000006	0,000006	0,000019	0,000019
Endosulfen	mg/L	0,000006	0,000006	0,000006	0,0000067	0,0000067
Endrin	mg/L	0,000006	0,000006	0,000006	0,0000023	0,0000023
Heptacloro	mg/L	0,0000038	0,0000038	0,0000038	0,0000036	0,0000036