



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA  
Y PARASITOLOGÍA**



**“Eficiencia de la remoción de plomo en agua residual sintética  
por bacterias aisladas del Dren 4000 en Lambayeque, 2013”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**BR. LUIS DAVID CERNA TAFUR**

**BR. LUIS EDER ELÍAS COTILLO**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2015**

**“Eficiencia de la remoción de plomo en agua residual sintética  
por bacterias aisladas del Dren 4000 en Lambayeque, 2013”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**APROBADO POR:**

M Sc. Clara Cueva Castillo

**PRESIDENTE**

---

Dr. César García Espinoza

**SECRETARIO**

---

Lic. Julio Silva Estela

**VOCAL**

---

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

**PATROCINADORA**

---

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2015**

## **DEDICATORIA**

### ***A Dios.***

*Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

### ***A mi madre Gladis***

*Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.*

### ***A mi padre Jorge.***

*Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.*

***David***

## DEDICATORIA

*A ti Dios por bendecirme, haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por darme la inteligencia, ser mi fortaleza y brindarme la posibilidad de culminar con éxito este proyecto.*

*Con mucho cariño a mis padres, Pedro y Elsa, que me dieron la vida y siempre han sido mi apoyo en todo momento, por inculcarme buenos valores y darme la posibilidad de tener una buena educación a lo largo de mi vida, y a pesar que hemos pasado momentos difíciles siempre con su apoyo y amor hemos seguido adelante, gracias por ser mis ejemplos a seguir.*

*A mis hermanos Julissa, Peter, Sammy y Alexandra, y a mi sobrinita Valeria por ser parte importante de mi vida. Sin su apoyo, colaboración e inspiración no habría sido posible culminar esta meta trazada.*

*A Fiori, por apoyarme en las buenas y en las malas, y sobre todo por su paciencia y amor.*

**Eder**

## **AGRADECIMIENTO**

*En primer lugar a Dios por darme la oportunidad de crecer como ser humano; en segundo lugar a cada persona que conforma la familia Cerna Tafur, por siempre haberme brindado su fuerza y apoyo incondicional que han ayudado y llevado hasta donde estoy ahora. A nuestros compañeros porque con su amistad y apoyo moral fueron grandes baluartes para lograr esta meta; y en forma especial, a nuestra asesora y amiga, la Dra. Carmen Carreño por su constante ayuda y motivación.*

**David.**

## AGRADECIMIENTO

*Agradezco a la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo por cobijarme y darme la oportunidad de una vida llena de aprendizajes para llegar a ser un profesional.*

*A mi asesora de tesis, Dra. Carmen Carreño Farfán por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia, su motivación y guía ha logrado que podamos acabar este proyecto de investigación con éxito.*

*Agradezco a los docentes, MSc. Clara Cueva Castillo, Ing. César García Espinoza y Lic. Julio Silva Estela que formaron parte de este proyecto y ayudaron con sus experiencias y conocimientos para culminar satisfactoriamente este proyecto.*

*También me gustaría agradecer a mis profesores que durante toda mi carrera profesional aportaron con sus enseñanzas, consejos y paciencia.*

*Y un agradecimiento especial a un gran amigo y compañero de tesis, David Cerna, por compartir esta experiencia como muy pocas en la vida pero que dejan la mayor de las satisfacciones, juntos hemos luchado y juntos hemos empujado hasta en los momentos más complicados este proyecto que culmina ahora y marca un nuevo inicio para la vida profesional, un abrazo y éxitos en todo!*

**Eder**

## Índice

|       |   |    |
|-------|---|----|
| I.    | INTRODUCCIÓN .....  | 1  |
| II.   | ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....   | 4  |
|       | 2.1 Antecedentes de la investigación .....  | 4  |
|       | 2.2 Base teórica.....   | 8  |
| III.  | MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 11 |
|       | 3.1 Materiales .....  | 11 |
|       | 3.2 Métodos .....   | 11 |
|       | 3.2.1 Población y muestra de estudio .....  | 11 |
|       | 3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis .....  | 11 |
|       | 3.2.3 Primera fase: Aislamiento de bacterias resistentes al plomo.....  | 12 |
|       | 3.2.4 Segunda fase: adaptación de bacterias a concentraciones crecientes de plomo y determinación de la eficiencia de remoción de plomo ..... | 25 |
| IV.   | RESULTADOS .....  | 31 |
|       | 4.1 Bacterias con resistencia natural al plomo aisladas .....   | 31 |
|       | 4.2 Bacterias nativas adaptadas a concentraciones crecientes de plomo.....  | 36 |
|       | 4.3 bacterias nativas resistentes al plomo seleccionadas e identificadas .....  | 36 |
|       | 4.4 Cinética de la remoción de plomo por bacterias seleccionadas.....   | 36 |
| V.    | DISCUSIÓN.....  | 50 |
| VI.   | CONCLUSIONES.....   | 54 |
| VII.  | RECOMENDACIONES.....  | 55 |
| VIII. | RESUMEN.....  | 56 |
| IX.   | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 57 |
| X.    | ANEXOS.....   | 61 |

## Índice de tablas

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Tabla 1.</b>  | Posición de los puntos de muestreo de aguas residuales vertidas al dren 4000 de Lambayeque, durante noviembre a diciembre de 2013.....               | 14 |
| <b>Tabla 2.</b>  | Características macroscópicas de las colonias de bacterias Gram positivas resistentes al plomo aisladas de aguas residuales en Lambayeque, 2013..... | 33 |
| <b>Tabla 3.</b>  | Características macroscópicas de las colonias de bacterias Gram negativas resistentes al plomo aisladas de aguas residuales en Lambayeque, 2013..... | 34 |
| <b>Tabla 4.</b>  | Absorbancia (600 nm) de bacterias nativas cultivadas en caldo infusión cerebro corazón con 100 ppm de plomo....                                      | 37 |
| <b>Tabla 5.</b>  | Absorbancia (600 nm) de bacterias nativas cultivadas en caldo infusión cerebro corazón con 200 ppm de plomo...                                       | 39 |
| <b>Tabla 6.</b>  | Absorbancia (600 nm) de bacterias nativas cultivadas en caldo infusión cerebro corazón con 400 ppm de plomo.....                                     | 41 |
| <b>Tabla 7.</b>  | Absorbancia (600 nm) de bacterias nativas cultivadas en caldo infusión cerebro corazón con 600 ppm de plomo....                                      | 42 |
| <b>Tabla 8.</b>  | Características diferenciales de bacterias nativas resistentes a 600 ppm de plomo.....   | 44 |
| <b>Tabla 9.</b>  | Valores de absorbancia (600 nm) de biomasa de <i>Acinetobacter</i> sp.19B.....   | 45 |
| <b>Tabla 10.</b> | Valores de absorbancia (600 nm) de biomasa de <i>Pseudomonas</i> sp.23D.....   | 46 |



|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Tabla 11.</b> | Valores de absorbancia (600 nm) de biomasa de <i>Burkholderia</i> sp.60D.....  | 47 |
| <b>Tabla 12.</b> | Concentración (mgL <sup>-1</sup> ) de biomasa de bacterias nativas en caldo infusión cerebro corazón con 600 ppm de plomo.....                                       | 49 |
| <b>Tabla 13.</b> | Parámetros cinéticos de la remoción de plomo en agua residual sintética por <i>Acinetobacter</i> sp.19B, <i>Pseudomonas</i> sp.23D y <i>Burkholderia</i> sp.60D..... | 49 |

## Índice de figuras

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Ubicación de la zona de muestreo, correspondiente a un sector del recorrido del Dren 4000, km 764 de la carretera Panamericana Norte en Lambayeque, 2013 ..... | 13 |
| <b>Figura 2.</b>  | Ubicación de los puntos de muestreo de aguas residuales durante enero a marzo de 2014.....   | 15 |
| <b>Figura 3.</b>  | Desembocadura del subcolector A que vierte sus aguas residuales al dren 4000 de Lambayeque.....  | 16 |
| <b>Figura 4</b>   | Desembocadura del subcolector B que vierte sus aguas residuales al dren 4000 de Lambayeque.....  | 16 |
| <b>Figura 5.</b>  | Desembocadura del subcolector C que vierte sus aguas residuales al dren 4000 de Lambayeque.....  | 17 |
| <b>Figura 6.</b>  | Biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente.....   | 18 |
| <b>Figura 7.</b>  | Diseño de biorreactor tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente.....   | 19 |
| <b>Figura 8.</b>  | Modo de operación de biorreactor tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente.....   | 20 |
| <b>Figura 9.</b>  | Obtención de muestra de agua residual.....   | 22 |
| <b>Figura 10.</b> | Caldo Infusión Cerebro Corazón suplementado con nitrato de plomo.....  | 22 |
| <b>Figura 11.</b> | Inoculación de agua residual en caldo Infusión Cerebro Corazón - nitrato de plomo .....  | 23 |
| <b>Figura 12.</b> | Colonias de bacterias desarrolladas en agar Infusión Cerebro Corazón - nitrato de plomo.....   | 23 |
| <b>Figura 13.</b> | Escala convencional para la calificación del crecimiento de bacterias resistentes al plomo.....  | 24 |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 14.</b> | Cultivos de bacterias en agar Infusión Cerebro Corazón - nitrato de plomo.....  | 26 |
| <b>Figura 15</b>  | Flujograma para la cuantificación de la biomasa por turbidimetría.....  | 28 |
| <b>Figura 16.</b> | Cultivos de bacterias tolerantes al plomo seleccionadas.....  | 29 |
| <b>Figura 17.</b> | Muestras de agua residual enriquecidas con plomo en biorreactores tipo tanque, con flujo de aire descendente.....                           | 32 |
| <b>Figura 18.</b> | Porcentaje de bacterias Gram positivas y Gram negativas resistentes al plomo aisladas de muestras de agua residual en Lambayeque, 2014..... | 32 |
| <b>Figura 19.</b> | Bacterias aisladas de aguas residuales según su crecimiento en agar infusión cerebro corazón con plomo.....                                 | 35 |
| <b>Figura 20.</b> | Cultivos de bacterias nativas según su adaptación a concentraciones crecientes de plomo.....  | 43 |
| <b>Figura 21.</b> | Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de <i>Acinetobacter</i> sp.19B.....  | 45 |
| <b>Figura 22.</b> | Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de <i>Pseudomonas</i> sp.23D.....  | 46 |
| <b>Figura 23.</b> | Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de <i>Burkholderia</i> sp 60D.....   | 47 |

## I. INTRODUCCIÓN

El plomo es un metal blando, maleable, gris azulado y resistente a la corrosión. Constituye un elemento natural ubicuo que se obtiene por fundición, refinamiento en las minas y secundariamente por el reciclamiento de residuos que contienen plomo. Se encuentra muy difundido en la corteza terrestre, con un promedio de  $16 \text{ mg kg}^{-1}$  y su forma más abundante es el sulfuro de plomo,  $\text{PbS}$  (Ramos *et al.*, 2009). El 65% de todo el plomo obtenido se utiliza como metal y 35 % como óxidos y sales orgánicas e inorgánicas (Ubillus, 2003). Además de su uso en la actividad minera, se encuentran las aplicaciones de la fundición industrial del metal en la fabricación de baterías y recubrimiento de cables de electricidad y teléfono, así como también, con la fundición informal se elaboran plomadas para pesca y artículos artesanales. Asimismo, el plomo se utiliza como aditivo de pinturas o como protección anticorrosiva de estructuras metálicas expuestas a la intemperie y la acción del mar.

En múltiples regiones del Perú se han identificado casos críticos de intoxicación por plomo, con efectos indeseables en la salud de sus pobladores; sin embargo, no se han implementado actividades de remediación para enfrentar la contaminación del suelo y agua y tampoco existe un plan para controlar los

residuos atmosféricos (AIDA, 2005). En la atmósfera el plomo se encuentra como material particulado (PM10) de tamaño inferior a 10  $\mu\text{m}$  (WHO, 2005) y en 2004 en la ciudad de La Oroya, departamento de Junín, sierra central del Perú, se cuantificaron 6,5  $\mu\text{g m}^{-3}$ , superando ampliamente 1,5  $\mu\text{g m}^{-3}$  que es el nivel máximo permisible para el plomo en el aire, según los Estándares Nacionales de Calidad del Aire: DS N° 074-2001-PCH (Pebe *et al.*, 2008). El plomo es persistente en el ambiente, habiéndose determinado que el suelo cerca de las fundiciones, aún después de culminadas las actividades es una fuente importante para la exposición en niños pequeños.

Las formas de extracción y concentración del mineral, cualquiera que sea su sistema conllevan al consumo de otros químicos tóxicos, que irresponsablemente son vertidos en los ríos. Cerca del 100% del parque automotriz consume baterías, en las que se utiliza plomo litargirio ( $\text{PbO}$ ) y las rejillas donde se acondicionan las placas también son de plomo, aleado con el metaloide tóxico antimonio. El área de recubrimientos con óxidos y sales de plomo, la industria del vidrio, tintes de cabello, cañerías antiguas y soldaduras de plomo generan residuos con el metal pesado y en todos los casos son evacuados por el desagüe (Ubillus, 2003). Se ha determinado que el río Chancay, entre febrero y junio, con un volumen de 40–400  $\text{m}^3 \text{segundo}^{-1}$  contiene cantidades de plomo, mercurio y arsénico nueve veces mayor que los límites determinados por la Organización Mundial de la Salud, sugiriéndose que la concentración se incrementa en los siguientes meses cuando el caudal baja a menos de 20  $\text{m}^3 \text{segundo}^{-1}$  (Vásquez, 2006).

Para la remoción de metales pesados en ambientes acuáticos existen diversos métodos físico-químicos, entre los que destacan: precipitación química, ósmosis, adsorción, filtración, intercambio iónico y ultracentrifugación, obteniéndose resultados satisfactorios. Desafortunadamente, dichos métodos no son efectivos con bajas concentraciones de metales pesados en disolución, especialmente si son menores de 100  $\text{mg L}^{-1}$ , tornándose poco viables para la industria, debido a su alto costo y complejidad y a su bajo rendimiento en condiciones reales. Además, estas tecnologías generan una elevada cantidad de lodos altamente tóxicos y difíciles de tratar (Cuizano & Navarro, 2008). Para la remoción de plomo se puede

aplicar la bioabsorción, es decir la utilización de tratamientos eficientes y menos costosos para remover y recuperar contaminantes del suelo, agua y gases. El contaminante es removido de forma activa y pasiva. Así, para eliminar metales pesados de aguas residuales, generalmente se utiliza biomasa microbiana fácilmente disponible, a partir de otros residuos contaminados, lo cual explica su potencial de adaptación a elementos presentes en el ambiente.

La bioabsorción representa una alternativa tecnológica eficiente y económicamente viable, pues se trata de un proceso rápido que permite tratar grandes volúmenes de agua con bajas concentraciones del metal. Por lo descrito, la obtención y caracterización de bacterias nativas para remoción de plomo servirá de base para posteriores investigaciones en el tratamiento de ambientes acuáticos contaminados con iones metálicos. En el Perú no existen tecnologías adecuadas que permitan resolver la contaminación de ambientes acuáticos por metales pesados, ni tampoco en la región Lambayeque se ha investigado la eficiencia de bacterias nativas en la remoción de plomo de efluentes contaminados.

Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema: ¿Cuál es la eficiencia de la remoción de plomo en agua residual sintética por bacterias aisladas del Dren 4000 en Lambayeque? Para resolver este problema se planteó como objetivo general determinar la eficiencia de la remoción de plomo en agua residual sintética por bacterias del Dren 4000 en Lambayeque. Los objetivos específicos fueron: aislar bacterias con resistencia natural al plomo de aguas residuales del Dren 4000 en Lambayeque, adaptar las bacterias nativas a concentraciones crecientes de plomo; seleccionar e identificar las tres bacterias nativas con resistencia a la mayor concentración de plomo y determinar la eficiencia de remoción de plomo. La hipótesis planteada fue: Las bacterias aisladas del Dren 4000 en Lambayeque alcanzan una eficiencia mayor de 60% en la remoción de plomo en agua residual sintética.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### a. Antecedentes de la investigación

La relación contaminante-microorganismo origina una serie de procesos adaptativos que se expresan como mecanismos de resistencia al contaminante. En este contexto, se investigó la resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de una bahía. Se colectaron muestras de agua en estaciones cercanas a descargas de efluentes domésticos e industriales y se sembraron en agar R2A y agar ENDO-C, incubando a 20°C, por 5 días. Se seleccionaron aleatoriamente 43 colonias y se investigó la resistencia a 3200; 1600; 800; 400 y 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ . El 100% de las bacterias fue resistente al  $\text{As}^{3+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ ; 77,7% al  $\text{Cu}^{2+}$  y 36,42 al  $\text{Ni}^{2+}$ . A su vez, todas las bacterias presentaron multirresistencia a la ampicilina, amikacina, cefomax, cefotaxima y nitrofurantoína, evidenciándose una vinculación entre la resistencia a metales pesados y antibióticos, que fue superior a 50% para  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  (Moraga *et al.*, 2003).

Con el objetivo de encontrar especies vegetales y microorganismos rizosféricos tolerantes a metales, se investigaron suelos con vertimientos

residuales de producción de cerámicas. Por su elevada concentración en el suelo ( $\text{mg Kg}^{-1}$  de materia seca) se determinó que los contaminantes fueron plomo (104 288,3) y zinc (9 536,7). Estos metales se detectaron en hojas y raíces de *Cynodon dactylon*, *Cyperus gigantus*, *Typha dominguensis* y *Xanthosoma cubense*, considerándose a *C. dactylon* hiperacumuladora de plomo. En esta maleza se colectó suelo rizosférico, se diluyó y sembró en agar nutritivo, Sabouraud Dextrosa y almidón amoniacal. Se aislaron 36 morfotipos de bacterias, cuatro hongos y dos actinomicetos, determinándose que el 33% de las bacterias toleró 0,5-2,0 mM de  $\text{PbCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ , considerándose promisorias para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados (Sánchez, 2008).

La absorción de metales con biomasa fúngica es atractiva, debido a la posibilidad de obtener biomasa en los residuos de los procesos industriales. La biosorción de plomo por biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*, esterilizada, no viable, fue estudiada en términos del efecto del pH y la temperatura, para determinar las condiciones óptimas en la remoción del catión metálico. En frascos de polipropileno se depositaron 150 mL de una solución de plomo (500, 700 y 1000 ppm) y el pH se ajustó a 5,0. Después, se adicionaron 0,15 g de biomasa, manteniendo los frascos en agitación constante (200 rpm) a 25°C. Durante 4 horas se tomaron muestras y se determinó la concentración del metal, mediante un espectrofotómetro de absorción atómica con las longitudes de onda: 261,4 para 5 a 800 ppm y 283,3 para 0,5 a 50 ppm de plomo. Se determinó que a pH 5,0 y 25°C la capacidad máxima ( $q_{\text{max}}$ ) biosorbente de la levadura fue de 0,5 g de  $\text{Pb g}^{-1}$  de biomasa y el 100% del plomo en solución fue retenido por la biomasa cuando la relación  $C_i/X_o$  fue menor a 0,25 (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Se investigaron los efectos de las condiciones de operación sobre la biosorción de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cr}^{3+}$  por biomasa de levaduras. Ésta se separó, se lavó tres veces con agua desionizada y posteriormente se filtró y secó a 106 °C por 24 horas. Después, se obtuvieron dos suspensiones con 2 y 5 g  $\text{L}^{-1}$  de biomasa sin lavar y lavada. Las soluciones de metales se prepararon disolviendo las sales  $\text{CrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  cada una por separado en soluciones stock y se combinaron posteriormente para obtener 50 y 80 ppm de



cada metal. El pH fue ajustado a 3 y 5. Las pruebas de biosorción se realizaron a 30 °C, en agitación constante por 24 horas y después se determinaron las concentraciones por espectroscopía de absorción atómica. A pH 5,0 los porcentajes de extracción de  $\text{Cr}^{3+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  fueron de 47 y 56 % respectivamente. A pH 3,0 la retención fue menor para todos los metales. A su vez, la afinidad del  $\text{Cd}^{2+}$  hacia la levadura fue mínima, concluyéndose que la presencia de co-iones electrolíticos interfiere en su adsorción (Rodríguez *et al.*, 2008).

La presencia de metales pesados en lodos ribereños procedentes de residuos industriales, influencia la calidad de los suelos, habiéndose encontrado mínimas concentraciones de  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  en vegetales de consumo humano. En esta zona se tomaron muestras de suelo y lodos y se mezclaron con el agente disgregante pirofosfato de sodio  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  al 0,1 % en una relación 2,5 volumen peso<sup>-1</sup>. Los recipientes se agitaron y luego se cuantificaron los metales y se aislaron las bacterias presentes. Después, éstas se sembraron en matraces con medio de cultivo suplementado con  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ , para seleccionar las bacterias tolerantes y transformadoras. En las muestras se encontró más de 0,005 mg de  $\text{Cr}^{6+}$  L<sup>-1</sup>, más de 0,049 mg de Pb L<sup>-1</sup> y más de 0,001 mg de Hg L<sup>-1</sup>, identificándose *Corynebacterium genitalium*, *C. diptheriae*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus sedentarius*, *Aeromonas hydrophila*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas* spp. A su vez, después del enriquecimiento selectivo con los metales, predominó *Micrococcus* frente a otras bacterias (Soto *et al.*, 2010).

Los metales pesados contaminan los mantos acuíferos y el suelo, requiriéndose de bacterias con capacidad para tolerarlos y acumularlos, como una alternativa para la biorremediación. En el presente estudio se aislaron bacterias de suelos contaminados con hidrocarburos, identificándose *Pseudomonas putida*, *P. mendocina*, *Burkholderia cepacia* y *Chromobacterium violaceum*. Para el proceso de biosorción se prepararon soluciones con 50 y 100 ppm de Cr, Pb y As y se agregaron 2 mL del inóculo bacteriano estandarizado a 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup>. Después de 7 días, a 25 °C, las soluciones se centrifugaron a 1500 rpm durante 30 minutos y el sedimento

celular se sometió a una digestión ácida total y parcial para determinar la concentración de los metales pesados por absorción atómica. La mayor adsorción de As se alcanzó con *P. mendocina*, de Cr con *B. cepacia* y *Chromobacterium violaceum* y de Pb con *P. putida* y *P. mendocina*. El metal con mayor acumulación (50–80 ppm) fue el plomo (Mendoza *et al.*, 2010).

En la búsqueda de especies microbianas con potencial para procesos de biorremediación se colectaron muestras de pilas de compostaje de residuos vegetales, lodos de depuradora desecados y residuos sólidos urbanos. Con las muestras se realizaron tres pases consecutivos en caldo nutritivo con 50 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  y luego se sembraron en medio sólido, obteniéndose 28 bacterias y 23 hongos tolerantes a la mezcla de metales pesados. Se seleccionaron cinco bacterias por su capacidad para retirar más del 60% de la concentración inicial de los metales pesados, especialmente el plomo, cuya concentración remanente no fue superior a 2,5 ppm, frente a la inicial de 50 ppm. El mecanismo predominante de eliminación fue de adsorción superficial, así como también se determinó eficacia como biosorbente de la biomasa no viable (López, 2011).

Se realizó una investigación para determinar el efecto del  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  sobre dos cepas de *Lactobacillus kefir* en condiciones de crecimiento (tolerancia) y no- crecimiento (biosorción). Las bacterias se cultivaron en caldo MRS diluido a la mitad de su concentración inicial con los cationes  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (0,02 - 10 mM) y en el caso del  $\text{Cd}^{2+}$  (0,002 - 1 mM). El  $\text{Pb}^{2+}$  retardó el crecimiento para ambas bacterias, sin cambios representativos en la biomasa después de 76 horas de cultivo con 10 mM. El  $\text{Zn}^{2+}$  (2,5 mM) y  $\text{Ni}^{2+}$  (2,5-5 mM) fueron tolerados, sin disminución de la biomasa. La micrografía electrónica de transmisión determinó la presencia de plomo en la superficie bacteriana evidenciándose la biosorción de este catión metálico. Después, se investigó la capacidad de adsorción de los metales en condiciones de no crecimiento, registrándose un rango de remoción de 20-40 % (Esteban, 2013).

## **b. Base teórica**

Metal pesado es todo elemento de naturaleza metálica con potencial para dañar el medio ambiente y elevada capacidad de resistencia a la biodegradación. Metales como el cobre, níquel y zinc, a muy bajas concentraciones son esenciales para la vida porque desempeñan un rol importante en los procesos metabólicos que acontecen en las células vivas; sin embargo, a niveles elevados estos metales son tóxicos para la mayoría de organismos procariotas y eucariotas. A su vez, metales como el cadmio, plomo y mercurio son no esenciales, es decir no cumplen alguna función biológica y son conocidos por causar diversos daños en organismos aún a muy bajas concentraciones (Richmond, 2004; Mejía, 2006).

Los metales pesados son considerados a nivel mundial como los contaminantes inorgánicos más importantes que pueden ser depositados en todo tipo de ecosistemas, siendo los recursos hídricos los de mayor riesgo, por su alta velocidad de propagación. No son biodegradables, lo cual permite su bioacumulación y biomagnificación en la naturaleza. Algunos metales pesados como el mercurio, cobre, plomo, cadmio, zinc y níquel están entre los contaminantes más comunes presentes en efluentes industriales y son tóxicos para los organismos, incluyendo los humanos (Sheng *et al.*, 2004).

El plomo es un metal perteneciente al grupo IV y periodo 6 de la tabla periódica con número atómico 82, masa atómica 207,2, densidad  $11,4 \text{ g cm}^{-3}$  y punto de fusión de  $327,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Wuana y Okieimen, 2011). Se considera como metal pesado y se ha convertido en el contaminante ambiental más importante, como resultado de su extracción de canteras, por actividades de fundición, pinturas, gasolina y explosivos que contienen plomo, así como de la eliminación de aguas residuales enriquecidas con dicho metal (Yang & Pan, 2002). Las formas más comunes del plomo en el suelo, agua subterránea y aguas superficiales son los complejos oxianiónicos, óxidos e hidróxidos de plomo así como su forma iónica ( $\text{Pb}^{+2}$ ), siendo estas dos últimas las configuraciones más estables; sin embargo, los fosfatos, carbonatos e hidróxidos de plomo son los compuestos insolubles más predominantes (Henry, 2000).

En el Perú, la empresa Cerro de Pasco Corporation (CPC) inició en 1956 sus actividades extractivas a tajo abierto para la explotación del cobre y en 1963 desarrolló también la explotación de zinc y plomo. Entre 1996 y 2006, estudios independientes realizados por el Ministerio de Salud del Perú (MINSA) y el Instituto Nacional de Salud (INS) determinaron que 53 % de niños y 9% de mujeres en edad fértil tenían plomo en la sangre en niveles mayores a  $10 \mu\text{g dL}^{-1}$  (Ramos *et al.*, 2004). A su vez, en el Callao, se ubican los depósitos de minerales de la Corporación de Minerales (CORMIN), conteniendo plata y zinc, así como también residuos que frecuentemente presentan alto contenido de plomo como contaminante (Ramos *et al.*, 2009). Según la Dirección General de Salud (DIGESA), los niños que acuden a los colegios cercanos al área de tratamiento registran una media de  $40,7 \text{ mg dL}^{-1}$  de plomo en sangre, mientras que en los niños de otras escuelas el nivel es de  $7,5 \text{ mg dL}^{-1}$ , concluyéndose que el vivir o estudiar cerca de los depósitos de plomo aumenta en casi 18 veces el riesgo de tener niveles elevados de plomo en la sangre (Hernández & Wegner, 2002).

Las interacciones metal-microbiota son investigadas en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados y radionucleótidos. Dependiendo del estado de oxidación de un metal y la especie que esté conformando, un microorganismo puede realizar dos transformaciones posibles. Una corresponde a la movilización del metal, es decir el pasaje de un estado insoluble inicial (metales asociados a suelos, sulfuros u óxidos metálicos) correspondiente a una fase sólida, a un estado soluble final, en fase acuosa. Este proceso se conoce con el nombre de lixiviación microbiana. El otro, corresponde a la inmovilización del metal, es decir el pasaje de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida. A su vez, existen en la naturaleza diferentes mecanismos por los cuales la inmovilización del metal puede llegar a ocurrir. Uno de los métodos de corrección biológica que se utiliza en la actualidad es la biorremediación (Rittmann&McCarty, 2001).

Según la Environmental Protection Agency (EPA), la biorremediación se define como los procesos en los que se usan los microorganismos o sus enzimas para transformar o degradar contaminantes tóxicos en los ecosistemas. Esta estrategia biológica depende de las propiedades catabólicas que presentan los microorganismos para utilizar los contaminantes en su desarrollo. Los contaminantes que se liberan en las superficies pueden ser transportados vertical y lateralmente a los suelos y aguas y eventualmente pueden ser inhalados o ingeridos a través de aguas para el consumo humano. Además, pueden ser absorbidos por plantas y tejidos animales. Estos contaminantes son llamados también xenobióticos, término que se refiere a las sustancias artificiales que no pertenecen a los sistemas biológicos naturales (Coyne, 2000).

En la absorción microbiana, llamada bioacumulación, las especies metálicas son efectivamente retenidas al interactuar con los fosfatos, proteínas y lípidos en el citoplasma celular, compitiendo con los iones sodio, potasio y calcio en los mecanismos biológicos. Las posibilidades de desarrollar una mayor capacidad absorbente dependen del tipo de microorganismo y su etapa de crecimiento (Flores *et al.*, 2001).

El término “biosorción”, se utiliza para referirse a la captación de metales que lleva a cabo una biomasa completa (viva o muerta), a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico. Cuando se utiliza biomasa viva, los mecanismos metabólicos de captación también pueden contribuir en el proceso. El proceso de biosorción involucra una fase sólida (sorbente) y una fase líquida (solvente, que es normalmente el agua) que contiene las especies disueltas que van a ser sorbidas (sorbato, iones metálicos). Debido a la gran afinidad del sorbente por las especies del sorbato, este último es atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos. Este proceso continúa hasta que se establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al sólido (a una concentración final o en el equilibrio). La afinidad del sorbente por el sorbato determina su distribución entre las fases sólida y líquida. La calidad del sorbente está dada por la cantidad del sorbato que puede atraer y retener en forma inmovilizada (Cañizares, 2000).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Material biológico**

Bacterias resistentes al plomo aisladas de aguas residuales.

##### **3.1.2 Población y muestra de estudio**

La población estuvo constituida por las bacterias resistentes al plomo de las aguas residuales vertidas en el Dren 4000 y se investigaron las bacterias aisladas de 54 unidades de muestreo colectadas durante noviembre a diciembre del 2013. El número de muestras fue calculado (Alvitres, 2000), tomando en cuenta una prevalencia de 90 % (Anexo 1) determinada en un muestreo piloto por los investigadores.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Variables en estudio**

Variable independiente: Bacterias aisladas del Dren 4000.

Variable dependiente: eficiencia de la remoción de plomo.

##### **3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis**

El trabajo de investigación fue descriptivo y se ejecutó en dos fases. En la primera fase se aislaron y seleccionaron las bacterias resistentes al plomo. En la

segunda fase las bacterias se adaptaron a concentraciones crecientes de plomo, se seleccionaron e identificaron las tres bacterias con la mayor concentración de biomasa y se determinó la eficiencia de la remoción de plomo. En ambas fases, se utilizó un diseño no experimental transeccional (Hernández *et al.*, 2003) y para contrastar la hipótesis el diseño de una sola casilla en la primera fase y el de sucesión o línea en la segunda fase (Alvitres, 2000).

### **3.2.3 Primera fase: Aislamiento de bacterias resistentes al plomo**

#### **a) Lugar de muestreo**

El muestreo se realizó en la desembocadura de los tres subcolectores que vierten aguas residuales en un sector del recorrido del Dren 4000, ubicado a la altura del kilómetro 764 en la carretera Panamericana Norte, Chosica del Norte, región Lambayeque (Figura 1), determinándose la posición de los puntos de muestreo (Tabla 1, figura 2) con un GPS GARMIN e Trex Vista HCx. Los subcolectores (Figuras 3, 4, 5) denominados A, B y C corresponden al Grupo Comercial Bari S.A., destiladora Chiclayo SAC y sector Chosica del Norte respectivamente (Guerrero, 2006).

#### **b) Acondicionamiento de biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente**

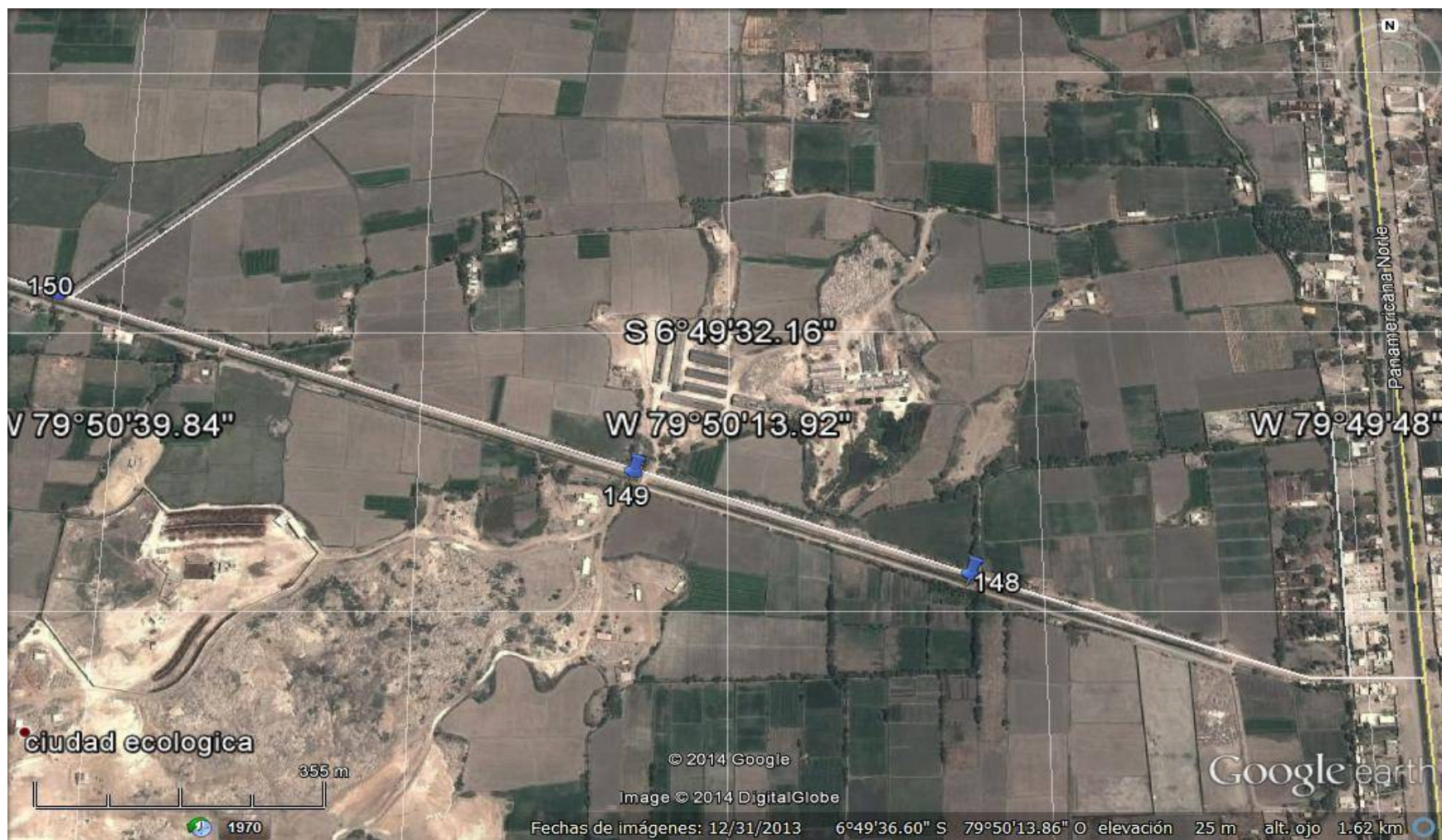
Se acondicionaron seis biorreactores (Figura 6) tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente, constituidos por frascos de 1 L de capacidad y ajustados a la geometría y proporciones de un biorreactor estándar según Hurtado y Guzmán, 2011 (Figuras 7, 8). El extremo superior de cada biorreactor estuvo cubierto por una tapa de goma que presentó dos orificios. A través del primer orificio ingresó una cánula de plástico llevando aire insuflado (1 vvm) por una compresora de aire Elite 803 de 4 watts y esterilizado por un sistema de burbujeo en cloruro de sodio al 30 %. Por el segundo orificio ingresó una cánula taponada en su extremo superior con algodón para permitir la salida de gases. Los frascos de vidrio se esterilizaron en horno (180 °C por 2 horas), el material de plástico y goma se sumergió en hipoclorito de sodio al 5% durante 30 horas y posteriormente fueron irradiados con luz ultravioleta por 0,5 horas.





**Tabla 1.** Posición de los puntos de muestreo de aguas residuales vertidas al dren 4000 de Lambayeque, durante noviembre a diciembre de 2013

| <b>Subcolector</b> | <b>Punto</b> | <b>Posición</b> | <b>(UTM) – 17M</b> | <b>msnm</b> |
|--------------------|--------------|-----------------|--------------------|-------------|
| A                  | 148          | 0628796         | 9245028            | 29          |
| B                  | 149          | 0628368         | 9245173            | 29          |
| C                  | 150          | 0627610         | 9245434            | 27          |



**Figura 2.** Ubicación de los puntos de muestreo de aguas residuales durante noviembre a diciembre de 2013.



**Figura 3.** Desembocadura del subcolector A que vierte sus aguas residuales al dren 4000 de Lambayeque.



**Figura 4.** Desembocadura del subcolector B que vierte sus aguas residuales al dren 4000 de Lambayeque.

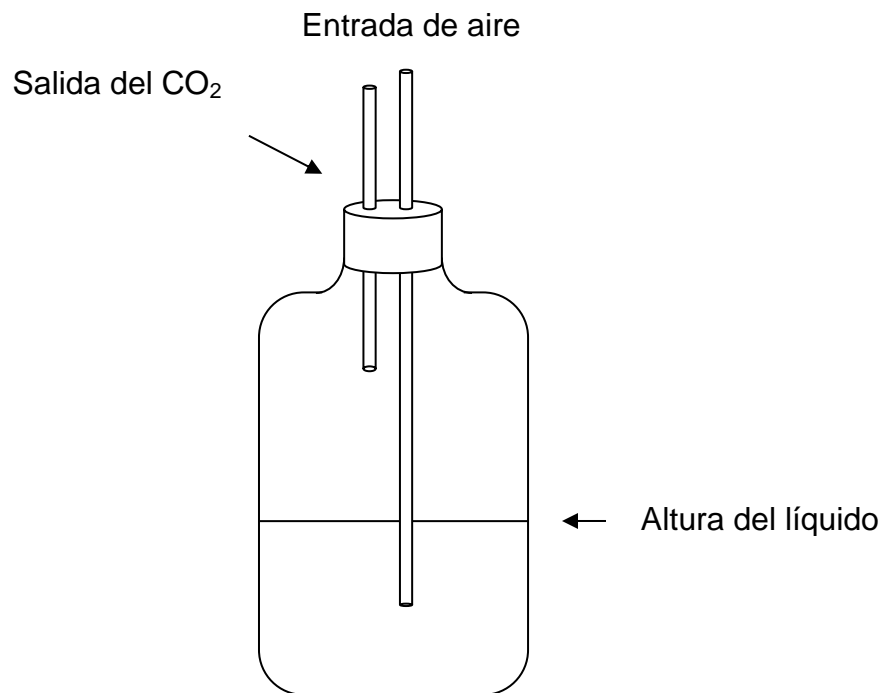




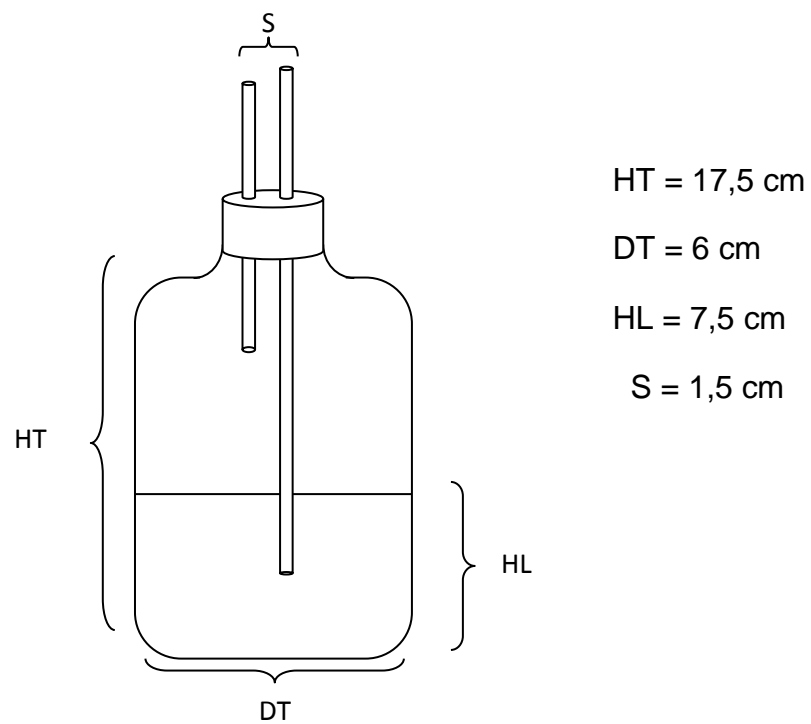
**Figura 5.** Desembocadura del subcolector C que vierte sus aguas residuales al dren 4000 de Lambayeque



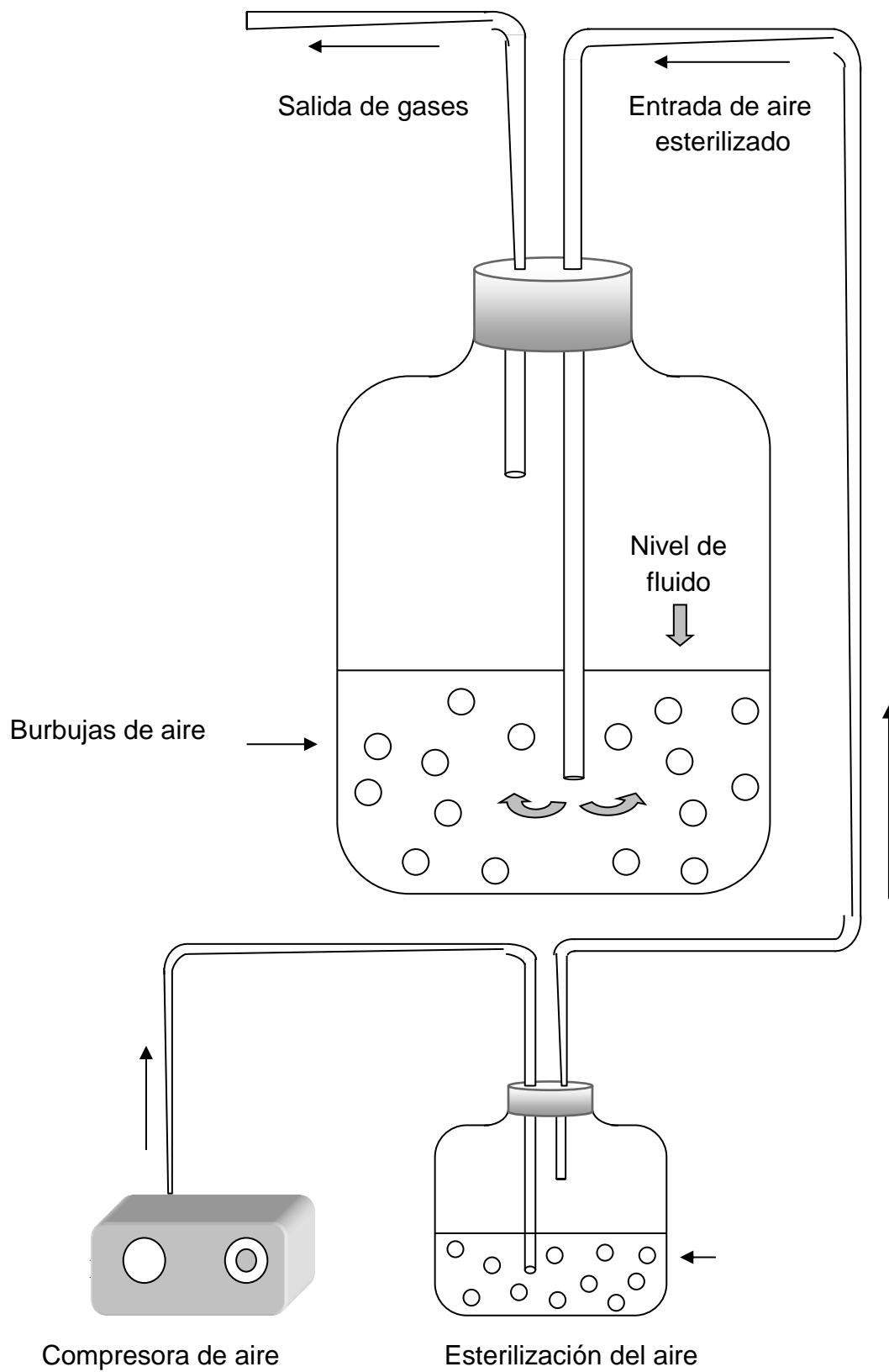
**Figura 6.** Biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente.



### PROPORCIONES



**Figura 7.** Diseño de biorreactor tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente.



**Figura 8.** Modo de operación de biorreactor tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente.

### **c) Obtención y enriquecimiento de las bacterias**

Las muestras de aguas residuales en cantidad de 100 mL fueron colectadas en la superficie de los subcolectores seleccionados y fueron depositadas en frascos de boca ancha (Figura 9), previamente esterilizados e inmediatamente fueron llevadas para su procesamiento al laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Posteriormente, en cada biorreactor se depositaron 45 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) suplementado con 2,5 mL de una disolución de nitrato de plomo:  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  tal que la concentración final del catión metálico fue de 50 ppm ó  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 10, anexos 2,3). Para el enriquecimiento de las bacterias según Guerrero (2006), 5 mL (10%) de cada muestra de agua residual fueron inoculados en los biorreactores (Figura 11) y se incubaron a temperatura ambiente ( $30^\circ\text{C}$ ) por 72 horas, con 10 minutos de agitación diaria, dos veces al día.

### **d) Aislamiento de bacterias con resistencia natural al plomo**

De cada muestra de agua residual con bacterias enriquecidas se tomó una alícuota y se sembró por agotamiento y estría en agar infusión Cerebro Corazón suplementado con 50 ppm de plomo. Transcurridas 48 horas de incubación, a  $30^\circ\text{C}$ , se seleccionaron las colonias (Figura 12) y se cultivaron por dos veces consecutivas en el mismo agar, para eliminar los contaminantes que podrían desarrollar en los restos de materia orgánica del agua residual (Guerrero, 2006). Las colonias obtenidas constituyeron los cultivos puros de bacterias resistentes al plomo, que fueron caracterizadas según su morfología macroscópica y microscópica (Brenner *et al.*, 2004).

### **e) Calificación del crecimiento de bacterias resistentes al plomo**

Las bacterias resistentes al plomo fueron sembradas en agar infusión Cerebro Corazón con 50 ppm de plomo, se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  por 48 horas y según el número de unidades formadoras de colonias (UFC) o el porcentaje de agar colonizado se calificó el crecimiento bacteriano con una escala convencional propuesta por Guerrero, 2006 (Figura 13).





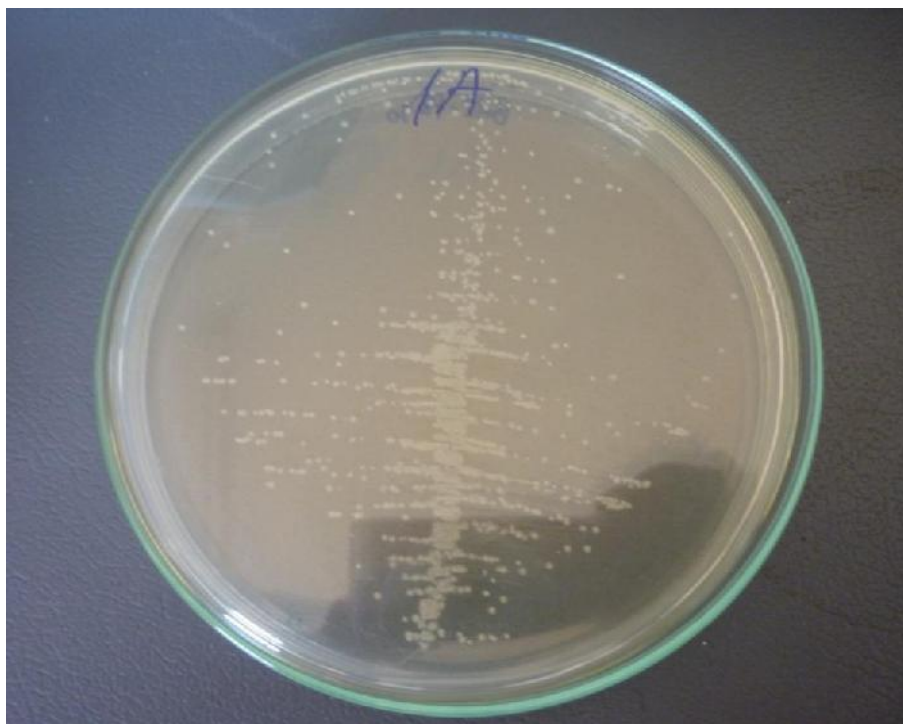
**Figura 9.** Obtención de muestra de agua residual.



**Figura 10.** Caldo Infusión Cerebro Corazón suplementado con nitrato de plomo.



**Figura 11.** Inoculación de agua residual en caldo Infusión Cerebro Corazón - nitrato de plomo.



**Figura 12.** Colonias de bacterias desarrolladas en agar Infusión Cerebro Corazón - nitrato de plomo.

| <b>Crecimiento bacteriano</b> | <b>Número de UFC</b> | <b>Agar con desarrollo bacteriano (%)</b> |
|-------------------------------|----------------------|---|
| +                             | 1-10                 | 1-20                                      |
| ++                            | 11-50                | 21-50                                     |
| +++                           | Más de 50            | Más de 50                                 |

**Figura 13.** Escala convencional para la calificación del crecimiento de bacterias resistentes al plomo.

#### **f) Mantenimiento de bacterias resistentes al plomo**

Las bacterias resistentes al plomo (Figura 14), fueron cultivadas en agar infusión Cerebro Corazón con 50 ppm de plomo durante 24 horas y luego fueron mantenidas en refrigeración (8°C), realizándose subcultivos cada 30 días.

### **3.2.4 Segunda fase: Adaptación de bacterias a concentraciones crecientes de plomo y determinación de la eficiencia de remoción de plomo**

#### **a) Adaptación de bacterias a concentraciones crecientes de plomo**

Para la adaptación a concentraciones crecientes de plomo según Chambergó & Herrera (2009), las bacterias nativas seleccionadas fueron sembradas en biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente, conteniendo 500 mL de agua residual, suplementada con 100 ppm de plomo (Anexo 3). Después de incubar a 30 °C, se tomaron alícuotas de los biorreactores con crecimiento bacteriano, denotado por turbidez y el proceso de adaptación se repitió en agua residual suplementada con concentraciones crecientes de plomo: 200, 300, 400, 500 y 600 ppm (Anexo 4), seleccionándose las tres bacterias que alcanzaron la mayor absorbancia a 600 nanómetros, con la mayor concentración de metal.

#### **b) Cuantificación de la biomasa por turbidimetría**

Para obtener el inóculo según Hurtado & Guzmán (2011), las tres bacterias resistentes al plomo seleccionadas, fueron sembradas por triplicado en agua residual suplementada con 600 ppm de plomo y fueron incubadas a 30 °C, con aireación constante (1 vvm), hasta alcanzar  $10^8 \text{ cel mL}^{-1}$ , concentración que se determinó por nefelometría. A continuación, 5 mL de cada inóculo se depositaron en biorreactores con 500 mL de agua residual suplementada con 600 ppm de plomo y se incubaron a 30 °C. Después de 10 horas, se tomaron submuestras de 2 mL, cada 2 horas para leer la absorbancia por espectrofotometría a 600 nm y determinar el tiempo óptimo de incubación o tiempo después del cual la concentración celular ya no se incrementó.



**Figura 14.** Cultivos de bacterias en agar Infusión Cerebro Corazón - nitrato de plomo.

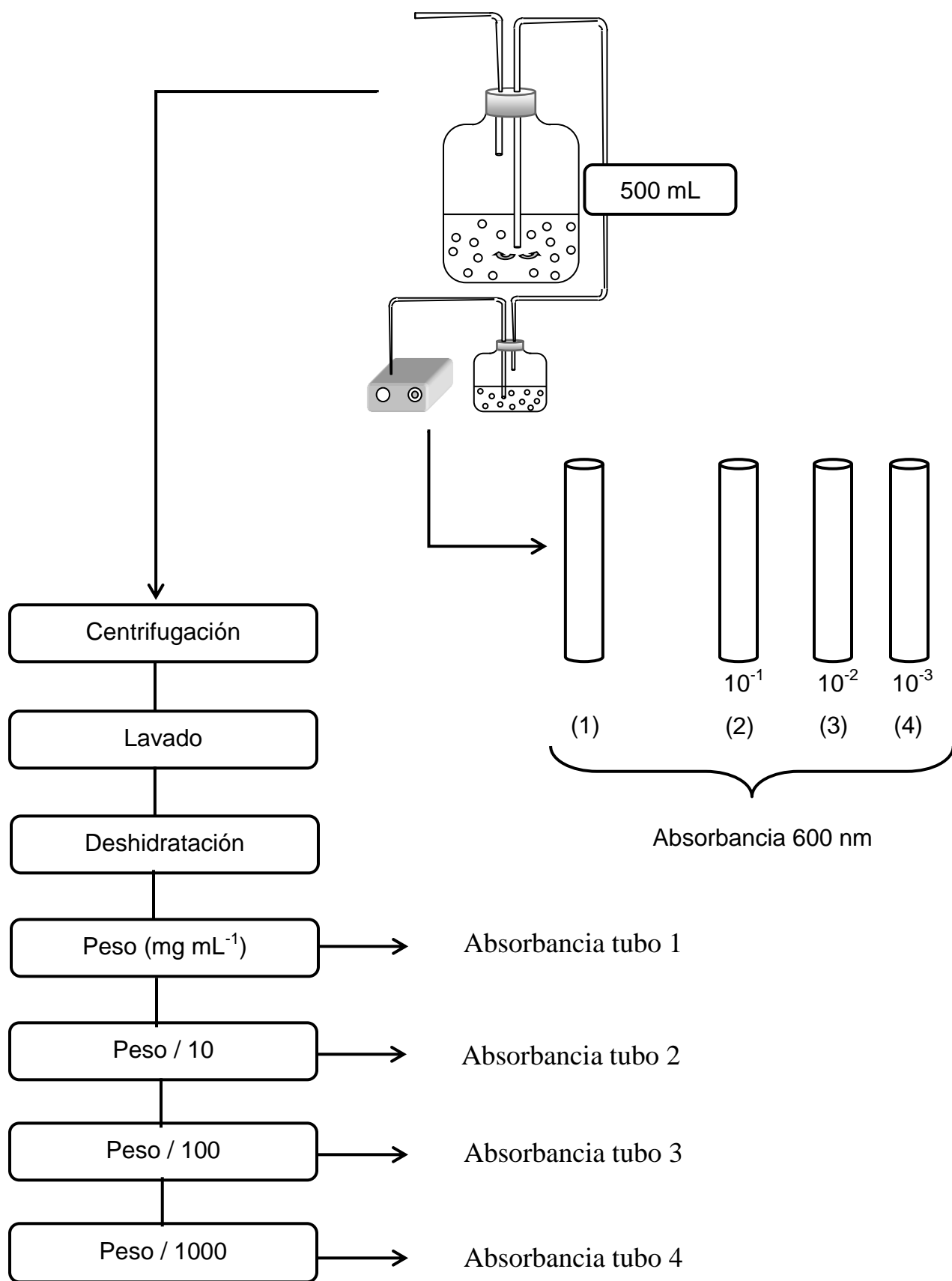
Transcurrido el tiempo óptimo de incubación, se tomaron muestras de 5 mL de los caldos cultivados y se determinó su absorbancia (Tubo 1). Luego, se realizaron diluciones decimales hasta  $10^{-3}$ , determinándose también su absorbancia a 600 nm (Tubos 2, 3, 4). El volumen restante de los caldos retirados se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. El sedimento o biomasa obtenida se lavó con agua destilada dos veces y se deshidrató a 40 °C, hasta alcanzar peso constante, determinándose posteriormente el peso de la biomasa deshidratada ( $\text{mg L}^{-1}$ ) que correspondió a la absorbancia del tubo 1. Después, el peso se dividió entre 10, 100 y 1000, correspondiendo los valores obtenidos a la absorbancia de los tubos 2, 3 y 4:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  (Figura 15). Con los valores registrados se obtuvo la ecuación de regresión, calculando el coeficiente de determinación  $R^2$ , que resultó ser mayor de 0,9 y que demostró una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

#### **c) Selección e identificación de bacterias resistentes al plomo**

Considerándose la biomasa, como una medida indirecta del plomo removido, para la siguiente prueba, se seleccionaron las bacterias (Figura 16) que alcanzaron la mayor concentración de biomasa, en el menor tiempo posible. Estas bacterias fueron identificadas mediante las pruebas convencionales de citocromo oxidasa, motilidad, óxido-fermentación de la glucosa, manitol, maltosa y lactosa, descarboxilación de la arginina, ornitina y lisina, hidrólisis de la esculina y la gelatina y la sensibilidad a la polimixina B y penicilina (Brenner *et al.*, 2004).

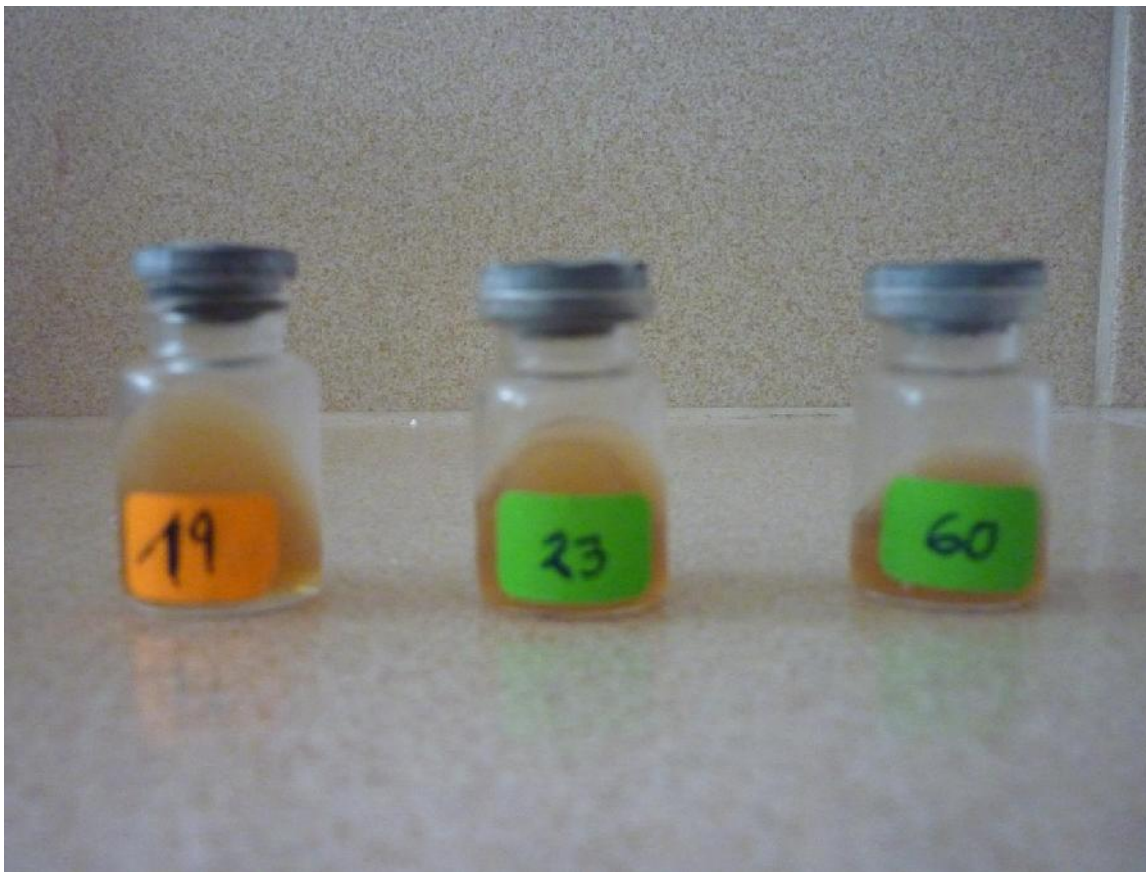
#### **d) Cinética de la remoción de plomo**

Las bacterias seleccionadas fueron inoculadas (5%) por triplicado en biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente (1 vvm), conteniendo 500 mL de agua residual con la concentración de plomo y en tiempo previamente determinados. Al inicio y al final del bioproceso, se determinaron las concentraciones ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de plomo (S) y de la biomasa (X). Se incluyó un control con células bacterianas inactivadas en autoclave a 121 °C, por 15 minutos.



**Figura 15.** Flujoograma para la cuantificación de la biomasa por turbidimetría.





**Figura 16.** Cultivos de bacterias resistentes al plomo seleccionadas.



La concentración de plomo se cuantificó en el laboratorio de Análisis físico-químico de la Empresa Prestadora de Servicios de Saneamiento de Lambayeque (EPSEL).

**e) Eficiencia de la remoción de plomo por bacterias nativas**

La eficiencia de la remoción de plomo por las bacterias nativas se calculó mediante la fórmula mencionada por Hurtado & Guzmán (2011).

$$\text{Remoción (\%)} = \frac{(Ci - Cf)}{Ci} \times 100$$

Donde:

Ci = concentración inicial de plomo

Cf = concentración final

**f) Análisis de los datos**

Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras, que permitieron determinar la eficiencia en la remoción del plomo por las bacterias nativas. Se utilizaron los programas Microsoft Office Word 2010 y Microsoft Office Excel 2010.

## **IV. RESULTADOS**

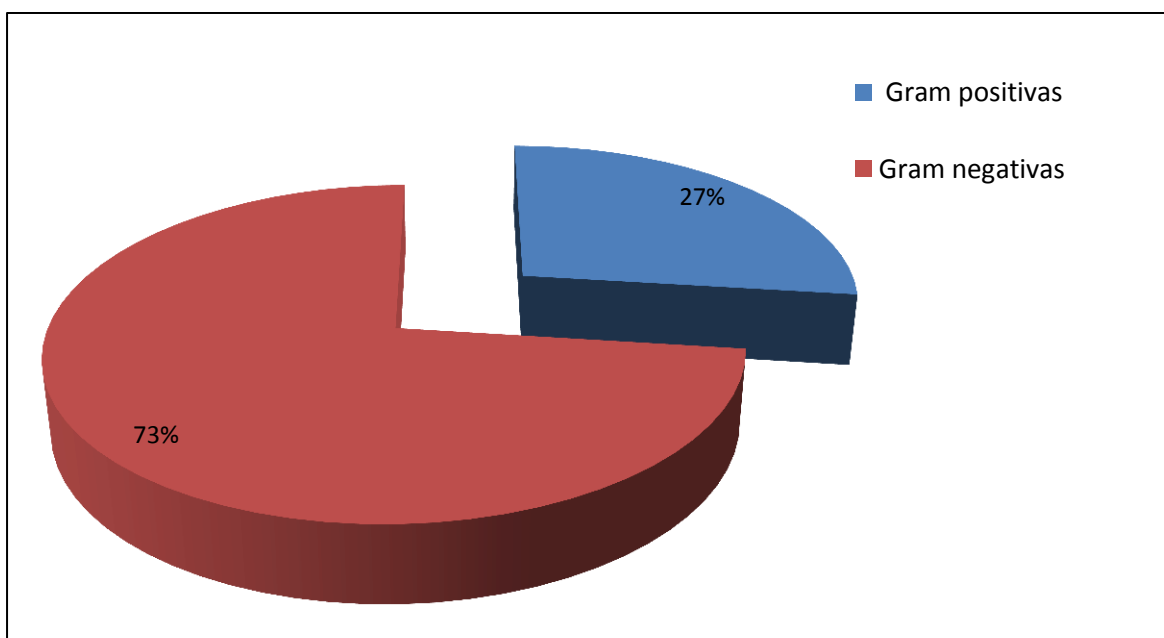
### **4.1. Bacterias con resistencia natural al plomo aisladas**

El 100% de muestras de agua residual resultaron positivas al enriquecimiento con plomo, observándose turbidez y película en cada uno de los biorreactores después de 48 horas de incubación, a 30°C (Figura 17). En el aislamiento se obtuvieron 475 cultivos puros de bacterias resistentes a 50 ppm de plomo, entre los que 73% correspondió a bacterias Gram negativas y 27% a bacterias Gram positivas (Figura 18). En las bacterias Gram positivas predominaron (27,34%) las colonias pequeñas, cremosas, convexas con bordes enteros (Tabla 2, anexo 5). En las bacterias Gram negativas, las colonias medianas, cremosas, convexas con bordes enteros fueron las mas frecuentes, alcanzando 23,34% (Tabla 3, anexo 5).

Con base al crecimiento bacteriano o número de colonias desarrolladas en agar infusión cerebro corazón con 50 ppm de plomo las bacterias fueron calificadas en tres grupos (Figura 19, anexo 6), correspondientes a 45% con 1-10 colonias (+), 13% con 11-50 colonias (++) y 42% con más de 50 colonias (+++).



**Figura 17.** Muestras de agua residual con bacterias enriquecidas con plomo en biorreactores tipo tanque, con flujo de aire descendente.



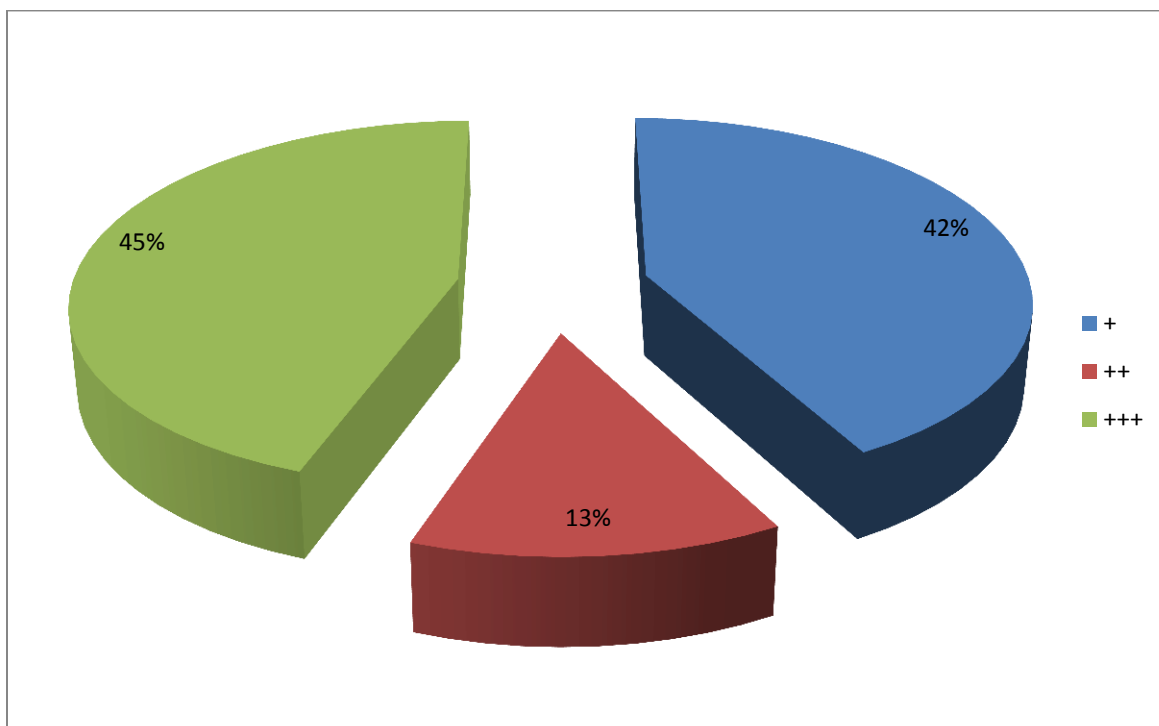
**Figura 18.** Porcentaje de bacterias Gram positivas y Gram negativas resistentes al plomo aisladas de muestras de agua residual en Lambayeque, 2013.

**Tabla 2.** Características macroscópicas de las colonias de bacterias Gram positivas resistentes al plomo aisladas de aguas residuales en Lambayeque, 2013

| <b>Colonia</b> |              |                  |              | <b>Cultivos puros</b> |          |
|----------------|--------------|------------------|--------------|-----------------------|----------|
| <b>Tamaño</b>  | <b>Color</b> | <b>Elevación</b> | <b>Borde</b> | <b>N°</b>             | <b>%</b> |
| Grande         | Cremosa      | Convexa          | Entero       | 13                    | 10,16    |
| Grande         | Translúcida  | Plana            | Entero       | 1                     | 0,78     |
| Grande         | Cremosa      | Convexa          | Irregular    | 3                     | 2,34     |
| Grande         | Blanca       | Convexa          | Irregular    | 3                     | 2,34     |
| Grande         | Blanca       | Convexa          | Entero       | 11                    | 8,59     |
| Grande         | Translúcida  | Convexa          | Entero       | 2                     | 1,56     |
| Mediana        | Cremosa      | Convexa          | Entero       | 27                    | 21,09    |
| Mediana        | Translúcida  | Convexa          | Entero       | 1                     | 0,78     |
| Mediana        | Blanca       | Convexa          | Entero       | 13                    | 10,16    |
| Mediana        | Translúcida  | Convexa          | Irregular    | 1                     | 0,78     |
| Mediana        | Blanca       | Convexa          | Irregular    | 2                     | 1,56     |
| Mediana        | Cremosa      | Convexa          | Irregular    | 4                     | 3,12     |
| Pequeña        | Cremosa      | Convexa          | Entero       | 35                    | 27,34    |
| Pequeña        | Blanca       | Convexa          | Entero       | 4                     | 3,12     |
| Pequeña        | Cremosa      | Convexa          | Irregular    | 1                     | 0,78     |
| Pequeña        | Translúcida  | Convexa          | Entero       | 4                     | 3,12     |
| Pequeña        | Blanca       | Convexa          | Irregular    | 2                     | 1,56     |
| Pequeña        | Blanca       | Plana            | Entero       | 1                     | 0,78     |

**Tabla 3.** Características macroscópicas de las colonias de bacterias Gram negativas resistentes al plomo aisladas de aguas residuales en Lambayeque, 2013

| Colonia |             |           |           |                |       |
|---------|-------------|-----------|-----------|----------------|-------|
| Tamaño  | Color       | Elevación | Borde     | Cultivos puros |       |
|         |             |           |           | N°             | %     |
| Grande  | Creмоса     | Convexa   | Entero    | 27             | 7,78  |
| Grande  | Translúcida | Plana     | Entero    | 1              | 0,29  |
| Grande  | Creмоса     | Convexa   | Irregular | 7              | 2,02  |
| Grande  | Blanca      | Convexa   | Irregular | 2              | 0,58  |
| Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | 32             | 9,22  |
| Grande  | Translúcida | Convexa   | Entero    | 5              | 1,44  |
| Grande  | Blanca      | Plana     | Irregular | 1              | 0,29  |
| Grande  | Translúcida | Convexa   | Irregular | 1              | 0,29  |
| Grande  | Translúcida | Convexa   | Entero    | 1              | 0,29  |
| Grande  | Blanca      | Plana     | Entero    | 1              | 0,29  |
| Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | 26             | 7,49  |
| Grande  | Roja        | Convexa   | Irregular | 4              | 1,15  |
| Mediana | Creмоса     | Convexa   | Entero    | 81             | 23,34 |
| Mediana | Translúcida | Convexa   | Entero    | 7              | 2,02  |
| Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | 30             | 8,64  |
| Mediana | Creмоса     | Convexa   | Irregular | 8              | 2,30  |
| Mediana | Translúcida | Convexa   | Irregular | 1              | 0,29  |
| Mediana | Blanca      | Convexa   | Irregular | 9              | 2,59  |
| Mediana | Roja        | Convexa   | Entero    | 2              | 0,58  |
| Mediana | Roja        | Plana     | Entero    | 1              | 0,29  |
| Mediana | Creмоса     | Plana     | Entero    | 1              | 0,29  |
| Mediana | Amarilla    | Convexa   | Entero    | 1              | 0,29  |
| Pequeña | Creмоса     | Convexa   | Entero    | 61             | 17,58 |
| Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | 25             | 7,20  |
| Pequeña | Creмоса     | Convexa   | Irregular | 3              | 0,86  |
| Pequeña | Translúcida | Convexa   | Entero    | 6              | 1,73  |
| Pequeña | Blanca      | Convexa   | Irregular | 1              | 0,29  |
| Pequeña | Translúcida | Convexa   | Irregular | 1              | 0,29  |
| Pequeña | Creмоса     | Plana     | Entero    | 1              | 0,29  |



**Figura 19.** Bacterias aisladas de aguas residuales según su crecimiento en agar infusión cerebro corazón con plomo.

## **4.2. Bacterias nativas adaptadas a concentraciones crecientes de plomo**

La absorbancia de las bacterias nativas cultivadas en caldo infusión cerebro corazón con 100ppm de plomo osciló entre 0,167 y 1,473 nm (Tabla 4). Con 200 ppm la absorbancia osciló entre 0,241 y 1,020 nm (Tabla 5). Con 400 ppm la absorbancia fue de 0,451 - 0,992 nm (Tabla 6) y con 600 ppm la absorbancia osciló entre 0,139 y 0,470 nm (Tabla 7). Los mayores valores en la absorbancia de las bacterias contenidas en caldo con 600 ppm de plomo correspondientes a 0,470; 0,430 y 0,388 se alcanzaron con los cultivos 23D, 60D y 19B (Tabla 7).

Las bacterias nativas se adaptaron a concentraciones crecientes de plomo (Figura 20); sin embargo, el porcentaje de bacterias disminuyó conforme se incrementó la concentración. De esta manera, se alcanzó 55,4% con 100 ppm; 40,2% con 200 ppm; 20,8% con 400 ppm y 14,7% con 600 ppm.

## **4.3 Bacterias nativas resistentes al plomo seleccionadas e identificadas**

Las tres bacterias seleccionadas por su resistencia a 600 ppm de plomo se identificaron como *Acinetobacter* sp.19B, *Pseudomonas* sp.23D y *Burkholderia* sp.60D (Tabla 8).

## **4.4 Cinética de la remoción de plomo por bacterias seleccionadas**

### **4.4.1 Curva patrón para el cálculo de la concentración de biomasa por turbidimetría**

Con los datos de absorbancia obtenidos con diferentes concentraciones de biomasa de las tres bacterias nativas seleccionadas, se obtuvieron las ecuaciones  $Y = 0,0039x + 0,1081$  (Tabla 9, figura 21);  $Y = 0,0018x + 0,1231$  (Tabla 10, figura 22) y  $Y = 0,0051x + 0,0804$  (Tabla 11, figura 23). Debido a que el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de cada una de las tres ecuaciones fue mayor de 0,9; éstas se aceptaron como patrones de referencia para el cálculo de la concentración de biomasa.

**Tabla 4.** Absorbancia (600 nm) de bacterias nativas cultivadas en caldo infusión cerebro corazón con 100 ppm de plomo

| Bacteria - Código | Absorbancia (600 nm) | Bacteria - Código | Absorbancia (600 nm) | Bacteria - Código | Absorbancia (600 nm) |
|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| 1 - 2C            | 1,473                | 45 - 23B          | 0,553                | 89 - 19D          | 0,505                |
| 2 - 28C           | 1,279                | 46 - 2A           | 0,553                | 90 - 51D          | 0,504                |
| 3 - 25C           | 1,112                | 47 - 131D         | 0,553                | 91 - 71B          | 0,503                |
| 4 - 1C            | 1,059                | 48 - 151D         | 0,548                | 92 - 99C          | 0,502                |
| 5 - 32D           | 0,952                | 49 - 89D          | 0,546                | 93 - 137C         | 0,502                |
| 6 - 15C           | 0,843                | 50 - 36D          | 0,542                | 94 - 112D         | 0,502                |
| 7 - 11B           | 0,678                | 51 - 106D         | 0,539                | 95 - 71C          | 0,501                |
| 8 - 44D           | 0,674                | 52 - 9A           | 0,538                | 96 - 51A          | 0,501                |
| 9 - 49D           | 0,671                | 53 - 26B          | 0,537                | 97 - 60B          | 0,501                |
| 10 - 25D          | 0,666                | 54 - 128D         | 0,536                | 98 - 80C          | 0,499                |
| 11 - 3C           | 0,636                | 55 - 131C         | 0,536                | 99 - 134C         | 0,499                |
| 12 - 28B          | 0,632                | 56 - 81B          | 0,536                | 100 - 133D        | 0,499                |
| 13 - 29D          | 0,620                | 57 - 145D         | 0,536                | 101 - 66C         | 0,498                |
| 14 - 36C          | 0,614                | 58 - 97D          | 0,535                | 102 - 61D         | 0,497                |
| 15 - 117D         | 0,612                | 59 - 50D          | 0,533                | 103 - 81C         | 0,496                |
| 16 - 116D         | 0,603                | 60 - 61A          | 0,532                | 104 - 66B         | 0,496                |
| 17 - 23C          | 0,601                | 61 - 94C          | 0,531                | 105 - 69A         | 0,495                |
| 18 - 24D          | 0,600                | 62 - 129D         | 0,528                | 106 - 102D        | 0,493                |
| 19 - 62D          | 0,599                | 63 - 103D         | 0,528                | 107 - 117C        | 0,491                |
| 20 - 53D          | 0,597                | 64 - 38B          | 0,525                | 108 - 73C         | 0,491                |
| 21 - 36B          | 0,596                | 65 - 28A          | 0,524                | 109 - 73B         | 0,491                |
| 22 - 42C          | 0,596                | 66 - 64B          | 0,523                | 110 - 108D        | 0,491                |
| 23 - 63D          | 0,594                | 67 - 50A          | 0,522                | 111 - 135C        | 0,489                |
| 24 - 132D         | 0,589                | 68 - 27B          | 0,522                | 112 - 65A         | 0,489                |
| 25 - 11A          | 0,588                | 69 - 140C         | 0,521                | 113 - 62B         | 0,489                |
| 26 - 57D          | 0,586                | 70 - 4A           | 0,521                | 114 - 68B         | 0,489                |
| 27 - 57C          | 0,584                | 71 - 56B          | 0,521                | 115 - 42D         | 0,487                |
| 28 - 60D          | 0,581                | 72 - 144D         | 0,521                | 116 - 76B         | 0,487                |
| 29 - 22D          | 0,581                | 73 - 125D         | 0,518                | 117 - 20C         | 0,486                |
| 30 - 10C          | 0,58                 | 74 - 50C          | 0,518                | 118 - 115C        | 0,483                |
| 31 - 92D          | 0,579                | 75 - 105D         | 0,517                | 119 - 137D        | 0,483                |
| 32 - 30B          | 0,576                | 76 - 27A          | 0,513                | 120 - 89A         | 0,482                |
| 33 - 18D          | 0,572                | 77 - 32A          | 0,513                | 121 - 83C         | 0,481                |
| 34 - 37C          | 0,572                | 78 - 88D          | 0,513                | 122 - 56C         | 0,480                |
| 35 - 32B          | 0,571                | 79 - 46C          | 0,512                | 123 - 146D        | 0,480                |
| 36 - 55D          | 0,570                | 80 - 106C         | 0,511                | 124 - 101D        | 0,479                |
| 37 - 75C          | 0,567                | 81 - 77A          | 0,509                | 125 - 48C         | 0,479                |
| 38 - 45D          | 0,567                | 82 - 110C         | 0,509                | 126 - 128C        | 0,478                |
| 39 - 12B          | 0,564                | 83 - 75B          | 0,509                | 127 - 57B         | 0,478                |
| 40 - 72C          | 0,563                | 84 - 136D         | 0,509                | 128 - 139D        | 0,478                |
| 41 - 52D          | 0,563                | 85 - 149D         | 0,509                | 129 - 82B         | 0,476                |
| 42 - 29A          | 0,562                | 86 - 120C         | 0,507                | 130 - 38D         | 0,475                |
| 43 - 71D          | 0,561                | 87 - 139C         | 0,507                | 131 - 91A         | 0,473                |
| 44 - 14B          | 0,559                | 88 - 138D         | 0,506                | 132 - 110D        | 0,473                |



Continuación...

| Bacteria -<br>Código | Absorbancia<br>(600 nm) | Bacteria -<br>Código | Absorbancia<br>(600 nm) | Bacteria -<br>Código | Absorbancia<br>(600 nm) |
|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| 133 - 33D            | 0,472                   | 177 - 84A            | 0,423                   | 221 - 91D            | 0,358                   |
| 134 - 43D            | 0,472                   | 178 - 64C            | 0,423                   | 222 - 89C            | 0,356                   |
| 135 - 148D           | 0,472                   | 179 - 48A            | 0,421                   | 223 - 66A            | 0,356                   |
| 136 - 24B            | 0,469                   | 180 - 102C           | 0,421                   | 224 - 20B            | 0,356                   |
| 137 - 114D           | 0,469                   | 181 - 72D            | 0,421                   | 225 - 126D           | 0,354                   |
| 138 - 120D           | 0,469                   | 182 - 2D             | 0,415                   | 226 - 99D            | 0,354                   |
| 139 - 9C             | 0,469                   | 183 - 58C            | 0,414                   | 227 - 25B            | 0,353                   |
| 140 - 81D            | 0,469                   | 184 - 123D           | 0,412                   | 228 - 90B            | 0,352                   |
| 141 - 23D            | 0,466                   | 185 - 52B            | 0,411                   | 229 - 77B            | 0,351                   |
| 142 - 33C            | 0,466                   | 186 - 40D            | 0,411                   | 230 - 116C           | 0,345                   |
| 143 - 98D            | 0,465                   | 187 - 35D            | 0,406                   | 231 - 147D           | 0,341                   |
| 144 - 31D            | 0,464                   | 188 - 46D            | 0,404                   | 232 - 12D            | 0,339                   |
| 145 - 72B            | 0,463                   | 189 - 130D           | 0,401                   | 233 - 63C            | 0,339                   |
| 146 - 37D            | 0,462                   | 190 - 66D            | 0,401                   | 234 - 16B            | 0,338                   |
| 147 - 78D            | 0,461                   | 191 - 7B             | 0,400                   | 235 - 82D            | 0,338                   |
| 148 - 113D           | 0,461                   | 192 - 67C            | 0,398                   | 236 - 14C            | 0,338                   |
| 149 - 119D           | 0,458                   | 193 - 122D           | 0,398                   | 237 - 115D           | 0,338                   |
| 150 - 79B            | 0,456                   | 194 - 70B            | 0,397                   | 238 - 74C            | 0,336                   |
| 151 - 59B            | 0,455                   | 195 - 55C            | 0,397                   | 239 - 16D            | 0,335                   |
| 152 - 124C           | 0,452                   | 196 - 47D            | 0,394                   | 240 - 63B            | 0,333                   |
| 153 - 19B            | 0,450                   | 197 - 96C            | 0,390                   | 241 - 65D            | 0,332                   |
| 154 - 108C           | 0,449                   | 198 - 53B            | 0,389                   | 242 - 62C            | 0,331                   |
| 155 - 55A            | 0,449                   | 199 - 88B            | 0,388                   | 243 - 135D           | 0,329                   |
| 156 - 56D            | 0,448                   | 200 - 45C            | 0,387                   | 244 - 127D           | 0,327                   |
| 157 - 22B            | 0,446                   | 201 - 61B            | 0,385                   | 245 - 141D           | 0,323                   |
| 158 - 15B            | 0,445                   | 202 - 11D            | 0,381                   | 246 - 113C           | 0,321                   |
| 159 - 65C            | 0,445                   | 203 - 78B            | 0,381                   | 247 - 118D           | 0,321                   |
| 160 - 98C            | 0,443                   | 204 - 105C           | 0,378                   | 248 - 28D            | 0,312                   |
| 161 - 143D           | 0,443                   | 205 - 29B            | 0,375                   | 249 - 129C           | 0,309                   |
| 162 - 93D            | 0,441                   | 206 - 142D           | 0,375                   | 250 - 67D            | 0,308                   |
| 163 - 55B            | 0,44                    | 207 - 8B             | 0,374                   | 251 - 2B             | 0,304                   |
| 164 - 4C             | 0,439                   | 208 - 27D            | 0,374                   | 252 - 107D           | 0,302                   |
| 165 - 64D            | 0,439                   | 209 - 31B            | 0,373                   | 253 - 5C             | 0,292                   |
| 166 - 67B            | 0,432                   | 210 - 121D           | 0,371                   | 254 - 58B            | 0,291                   |
| 167 - 95D            | 0,431                   | 211 - 86D            | 0,371                   | 255 - 65B            | 0,290                   |
| 168 - 25A            | 0,430                   | 212 - 125C           | 0,369                   | 256 - 85B            | 0,283                   |
| 169 - 48D            | 0,428                   | 213 - 5B             | 0,369                   | 257 - 17B            | 0,262                   |
| 170 - 87B            | 0,428                   | 214 - 83B            | 0,369                   | 258 - 54D            | 0,250                   |
| 171 - 134D           | 0,427                   | 215 - 94D            | 0,369                   | 259 - 59D            | 0,246                   |
| 172 - 8D             | 0,426                   | 216 - 13C            | 0,369                   | 260 - 10B            | 0,223                   |
| 173 - 74B            | 0,425                   | 217 - 34A            | 0,368                   | 261 - 21D            | 0,221                   |
| 174 - 40B            | 0,425                   | 218 - 69B            | 0,365                   | 262 - 39C            | 0,182                   |
| 175 - 53C            | 0,424                   | 219 - 21C            | 0,365                   | 263 - 1D             | 0,167                   |
| 176 - 124D           | 0,423                   | 220 - 58D            | 0,360                   |                      |                         |

**Tabla 5.** Absorbancia (600 nm) de bacterias nativas cultivadas en caldo infusión cerebro corazón con 200 ppm de plomo

| Bacteria - Código | Absorbancia (600 nm) | Bacteria - Código | Absorbancia (600 nm) | Bacteria - Código | Absorbancia (600 nm) |
|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| 1 - 64D           | 1,020                | 39 - 30B          | 0,498                | 77 - 61D          | 0,432                |
| 2 - 60 D          | 0,931                | 40 - 60B          | 0,498                | 78 - 132D         | 0,431                |
| 3 - 48D           | 0,76                 | 41 - 82B          | 0,495                | 79 - 37D          | 0,430                |
| 4 - 63D           | 0,754                | 42 - 134D         | 0,495                | 80 - 137C         | 0,429                |
| 5 - 4C            | 0,751                | 43 - 23B          | 0,494                | 81 - 92D          | 0,429                |
| 6 - 36B           | 0,701                | 44 - 56 C         | 0,492                | 82 - 117D         | 0,428                |
| 7 - 35D           | 0,674                | 45 - 72C          | 0,489                | 83 - 128D         | 0,428                |
| 8 - 38B           | 0,606                | 46 - 95D          | 0,483                | 84 - 56B          | 0,423                |
| 9 - 112D          | 0,601                | 47 - 79B          | 0,481                | 85 - 115C         | 0,423                |
| 10 - 19B          | 0,598                | 48 - 14B          | 0,475                | 86 - 52D          | 0,422                |
| 11 - 133D         | 0,587                | 49 - 28B          | 0,473                | 87 - 98C          | 0,421                |
| 12 - 108D         | 0,583                | 50 - 98D          | 0,473                | 88 - 32A          | 0,42                 |
| 13 - 114D         | 0,579                | 51 - 53C          | 0,471                | 89 - 102D         | 0,419                |
| 14 - 32D          | 0,578                | 52 - 124D         | 0,471                | 90 - 130D         | 0,417                |
| 15 - 75B          | 0,564                | 53 - 2D           | 0,468                | 91 - 65A          | 0,413                |
| 16 - 138D         | 0,563                | 54 - 81B          | 0,466                | 92 - 134C         | 0,412                |
| 17 - 52B          | 0,561                | 55 - 49D          | 0,464                | 93 - 139D         | 0,411                |
| 18 - 66D          | 0,557                | 56 - 120C         | 0,461                | 94 - 62D          | 0,407                |
| 19 - 129D         | 0,553                | 57 - 44D          | 0,46                 | 95 - 106C         | 0,406                |
| 20 - 149D         | 0,551                | 58 - 11B          | 0,459                | 96 - 43D          | 0,404                |
| 21 - 3C           | 0,55                 | 59 - 81D          | 0,459                | 97 - 15C          | 0,403                |
| 22 - 50D          | 0,545                | 60 - 33C          | 0,458                | 98 - 23D          | 0,403                |
| 23 - 148D         | 0,544                | 61 - 57D          | 0,458                | 99 - 29D          | 0,401                |
| 24 - 33D          | 0,54                 | 62 - 110D         | 0,457                | 100 - 26B         | 0,398                |
| 25 - 68B          | 0,539                | 63 - 75C          | 0,456                | 101 - 64B         | 0,397                |
| 26 - 31D          | 0,538                | 64- 40D           | 0,454                | 102 - 143D        | 0,397                |
| 27 - 144D         | 0,538                | 65 - 67B          | 0,453                | 103 - 89D         | 0,395                |
| 28 - 38D          | 0,523                | 66 - 88D          | 0,453                | 104 - 71C         | 0,394                |
| 29 - 146D         | 0,521                | 67 - 22B          | 0,452                | 105 - 55B         | 0,389                |
| 30 - 15B          | 0,517                | 68 - 66B          | 0,444                | 106 - 139C        | 0,389                |
| 31 - 72B          | 0,512                | 69 - 72D          | 0,444                | 107 - 106D        | 0,389                |
| 32 - 119D         | 0,512                | 70 - 81C          | 0,441                | 108 - 87B         | 0,388                |
| 33 - 59B          | 0,51                 | 71 - 120D         | 0,439                | 109 - 113D        | 0,388                |
| 34 - 32B          | 0,509                | 72 - 36D          | 0,435                | 110 - 131D        | 0,387                |
| 35 - 8D           | 0,507                | 73 - 45D          | 0,435                | 111 - 71B         | 0,381                |
| 36 - 105D         | 0,502                | 74 - 137D         | 0,435                | 112 - 40B         | 0,38                 |
| 37 - 62B          | 0,501                | 75 - 46D          | 0,434                | 113 - 24B         | 0,374                |
| 38 - 103D         | 0,499                | 76 - 73B          | 0,432                | 114 - 89A         | 0,373                |

Continuación...

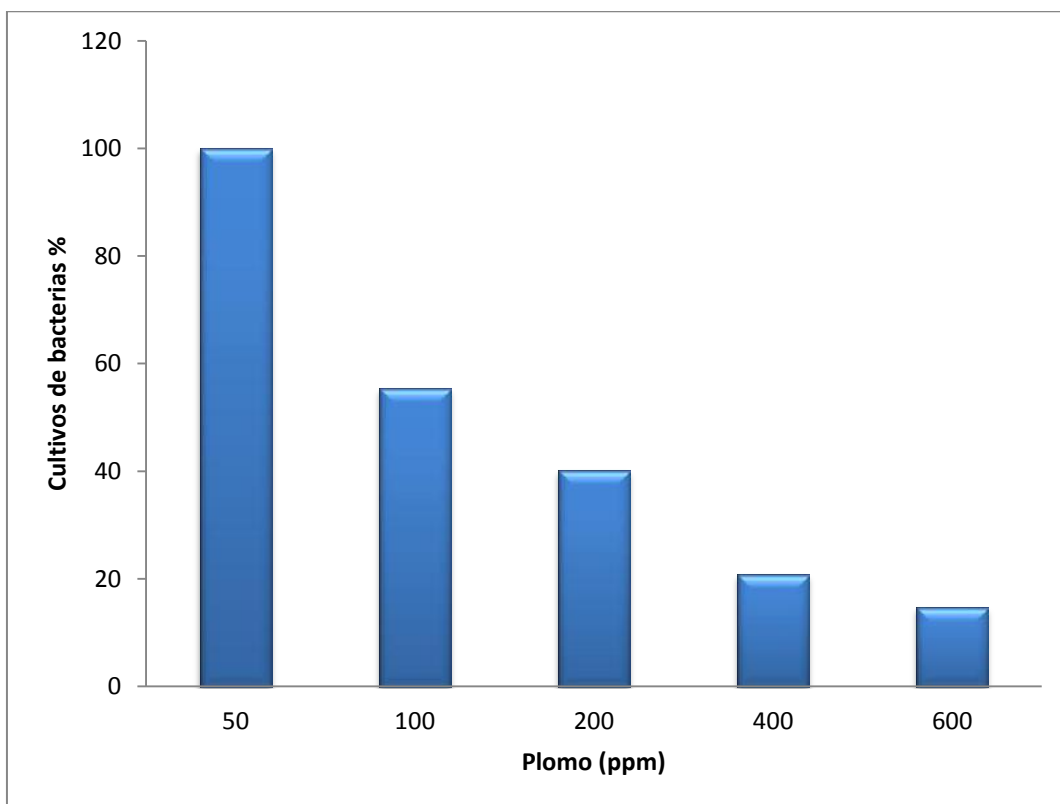
| Bacteria -<br>Código | Absorbancia<br>(600 nm) | Bacteria -<br>Código | Absorbancia<br>(600 nm) | Bacteria -<br>Código | Absorbancia<br>(600 nm) |
|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| 115 - 74B            | 0,371                   | 141 - 131C           | 0,339                   | 167 - 1C             | 0,319                   |
| 116 - 84A            | 0,369                   | 142 - 91A            | 0,340                   | 168 - 42C            | 0,318                   |
| 117 - 99C            | 0,369                   | 143 - 9A             | 0,336                   | 169 - 110C           | 0,318                   |
| 118 - 91A            | 0,368                   | 144 - 57B            | 0,336                   | 170 - 2A             | 0,315                   |
| 119 - 97D            | 0,366                   | 145 - 64C            | 0,336                   | 171 - 53D            | 0,315                   |
| 120 - 25A            | 0,365                   | 146 - 145D           | 0,336                   | 172 - 25D            | 0,314                   |
| 121 - 125D           | 0,365                   | 147 - 29A            | 0,334                   | 173 - 28C            | 0,312                   |
| 122 - 48A            | 0,364                   | 148 - 71D            | 0,333                   | 174 - 48C            | 0,312                   |
| 123 - 108C           | 0,364                   | 149 - 77A            | 0,332                   | 175 - 56D            | 0,312                   |
| 124 - 124C           | 0,364                   | 150 - 128C           | 0,332                   | 176 - 116D           | 0,312                   |
| 125 - 11A            | 0,363                   | 151 - 46C            | 0,33                    | 177 - 9C             | 0,311                   |
| 126 - 58C            | 0,363                   | 152 - 117C           | 0,329                   | 178 - 78D            | 0,308                   |
| 127 - 12B            | 0,361                   | 153 - 22D            | 0,328                   | 179 - 27B            | 0,306                   |
| 128 - 66C            | 0,358                   | 154 - 51D            | 0,328                   | 180 - 73C            | 0,306                   |
| 129 - 102C           | 0,358                   | 155 - 28A            | 0,327                   | 181 - 24D            | 0,304                   |
| 130 - 101D           | 0,358                   | 156 - 35C            | 0,327                   | 182 - 7B             | 0,303                   |
| 131 - 93D            | 0,356                   | 157 - 57C            | 0,327                   | 183 - 140C           | 0,302                   |
| 132 - 136D           | 0,354                   | 158 - 55D            | 0,325                   | 184 - 55A            | 0,301                   |
| 133 - 37C            | 0,351                   | 159 - 42D            | 0,324                   | 185 - 76B            | 0,301                   |
| 134 - 94C            | 0,351                   | 160 - 50A            | 0,323                   | 186 - 151D           | 0,301                   |
| 135 - 135C           | 0,351                   | 161 - 83C            | 0,323                   | 187 - 27A            | 0,298                   |
| 136 - 10C            | 0,348                   | 162 - 19D            | 0,323                   | 188 - 50C            | 0,298                   |
| 137 - 4A             | 0,346                   | 163 - 36C            | 0,322                   | 189 - 51A            | 0,293                   |
| 138 - 80C            | 0,346                   | 164 - 65C            | 0,321                   | 190 - 61A            | 0,266                   |
| 139 - 2C             | 0,345                   | 165 - 123D           | 0,321                   | 191 - 69A            | 0,241                   |
| 140 - 23C            | 0,34                    | 166 - 18D            | 0,32                    |                      |                         |

**Tabla 6.** Absorbancia (600 nm) de bacterias nativas cultivadas en caldo infusión cerebro corazón con 400 ppm de plomo

| Bacteria - Código | Absorbancia (600 nm) | Bacteria - Código | Absorbancia (600 nm) | Bacteria - Código | Absorbancia (600 nm) |
|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| 1 - 32D           | 0,992                | 34 - 36D          | 0,693                | 67 - 66B          | 0,609                |
| 2 - 4C            | 0,971                | 35 - 73B          | 0,689                | 68 - 120C         | 0,609                |
| 3 - 60D           | 0,915                | 36 - 62B          | 0,688                | 69 - 36B          | 0,606                |
| 4 - 48D           | 0,912                | 37 - 137C         | 0,687                | 70 - 128D         | 0,602                |
| 5 - 64D           | 0,842                | 38 - 45D          | 0,687                | 71 - 1C           | 0,598                |
| 6 - 38D           | 0,802                | 39 - 32B          | 0,686                | 72 - 112D         | 0,593                |
| 7 - 50D           | 0,802                | 40 - 52B          | 0,679                | 73 - 44D          | 0,592                |
| 8 - 33C           | 0,796                | 41 - 110D         | 0,679                | 74 - 72B          | 0,590                |
| 9 - 63D           | 0,780                | 42 - 79B          | 0,673                | 75 - 66C          | 0,590                |
| 10 - 139D         | 0,776                | 43 - 72D          | 0,667                | 76 - 120D         | 0,589                |
| 11 - 19B          | 0,758                | 44 - 11B          | 0,657                | 77 - 133D         | 0,587                |
| 12 - 30B          | 0,757                | 45 - 88D          | 0,654                | 78 - 57D          | 0,582                |
| 13 - 35D          | 0,754                | 46 - 8D           | 0,652                | 79 - 75C          | 0,581                |
| 14 - 23D          | 0,751                | 47 - 38B          | 0,647                | 80 - 81B          | 0,563                |
| 15 - 56C          | 0,747                | 48 - 2D           | 0,645                | 81 - 37D          | 0,560                |
| 16 - 148D         | 0,739                | 49 - 105D         | 0,645                | 82 - 67B          | 0,559                |
| 17 - 117D         | 0,738                | 50 - 129D         | 0,639                | 83 - 106C         | 0,556                |
| 18 - 138D         | 0,721                | 51 - 53C          | 0,638                | 84 - 81D          | 0,551                |
| 19 - 33D          | 0,719                | 52 - 60B          | 0,636                | 85 - 134C         | 0,543                |
| 20 - 14B          | 0,717                | 53 - 81C          | 0,633                | 86 - 52D          | 0,537                |
| 21 - 31D          | 0,717                | 54 - 102D         | 0,631                | 87 - 130D         | 0,526                |
| 22 - 134D         | 0,713                | 55 - 49D          | 0,630                | 88 - 15C          | 0,508                |
| 23 - 3C           | 0,712                | 56 - 124D         | 0,628                | 89 - 103D         | 0,506                |
| 24 - 108D         | 0,709                | 57 - 56B          | 0,621                | 90 - 40 D         | 0,504                |
| 25 - 146D         | 0,706                | 58 - 72C          | 0,621                | 91 - 98D          | 0,498                |
| 26 - 92D          | 0,705                | 59 - 15B          | 0,619                | 92 - 59B          | 0,489                |
| 27 - 75B          | 0,703                | 60 - 119D         | 0,617                | 93 - 2C           | 0,487                |
| 28 - 98C          | 0,703                | 61 - 66D          | 0,616                | 94 - 61D          | 0,485                |
| 29 - 132D         | 0,701                | 62 - 114D         | 0,613                | 95 - 32A          | 0,479                |
| 30 - 137D         | 0,699                | 63 - 68B          | 0,611                | 96 - 28B          | 0,478                |
| 31 - 82B          | 0,698                | 64 - 149D         | 0,611                | 97 - 23B          | 0,470                |
| 32 - 115C         | 0,698                | 65 - 46D          | 0,610                | 98 - 22B          | 0,464                |
| 33 - 95D          | 0,697                | 66 - 144D         | 0,610                | 99 - 65A          | 0,451                |

**Tabla 7.** Absorbancia (600 nm) de bacterias nativas cultivadas en caldo infusión cerebro corazón con 600 ppm de plomo

| Bacteria - Código | Absorbancia (600 nm) | Bacteria - Código | Absorbancia (600 nm) | Bacteria - Código | Absorbancia (600 nm) |
|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| 1 - 23D           | 0,470                | 25 - 132D         | 0,307                | 49 - 48D          | 0,243                |
| 2 - 60D           | 0,430                | 26 - 114D         | 0,305                | 50 - 36D          | 0,238                |
| 3 - 19B           | 0,388                | 27 - 137D         | 0,305                | 51 - 32D          | 0,236                |
| 4 - 14B           | 0,374                | 28 - 72C          | 0,292                | 52 - 144D         | 0,232                |
| 5 - 35D           | 0,368                | 29 - 95D          | 0,291                | 53 - 38B          | 0,231                |
| 6 - 64D           | 0,353                | 30 - 33C          | 0,29                 | 54 - 88D          | 0,228                |
| 7 - 30B           | 0,343                | 31 - 129D         | 0,29                 | 55 - 68B          | 0,227                |
| 8 - 2D            | 0,343                | 32 - 75B          | 0,289                | 56 - 98C          | 0,223                |
| 9 - 62B           | 0,33                 | 33 - 117D         | 0,288                | 57 - 148D         | 0,219                |
| 10 - 60B          | 0,324                | 34 - 81C          | 0,281                | 58 - 38D          | 0,215                |
| 11 - 66B          | 0,322                | 35 - 82B          | 0,278                | 59 - 4C           | 0,214                |
| 12 - 15B          | 0,321                | 36 - 124D         | 0,271                | 60 - 46D          | 0,212                |
| 13 - 52B          | 0,319                | 37 - 110D         | 0,269                | 61 - 56B          | 0,211                |
| 14 - 128D         | 0,319                | 38 - 146D         | 0,265                | 62 - 149D         | 0,205                |
| 15 - 66D          | 0,315                | 39 - 115C         | 0,264                | 63 - 31D          | 0,203                |
| 16 - 119D         | 0,315                | 40 - 134D         | 0,263                | 64 - 72D          | 0,199                |
| 17 - 32B          | 0,313                | 41 - 120C         | 0,261                | 65 - 56C          | 0,164                |
| 18 - 79B          | 0,311                | 42 - 11B          | 0,26                 | 66 - 45D          | 0,164                |
| 19 - 102D         | 0,311                | 43 - 137C         | 0,255                | 67 - 53C          | 0,163                |
| 20 - 33D          | 0,31                 | 44 - 8D           | 0,254                | 68 - 36B          | 0,155                |
| 21 - 73B          | 0,309                | 45 - 63D          | 0,253                | 69 - 49D          | 0,154                |
| 22 - 92D          | 0,309                | 46 - 3C           | 0,251                | 70 - 50D          | 0,139                |
| 23 - 139D         | 0,309                | 47 - 105D         | 0,245                |                   |                      |
| 24 - 108D         | 0,308                | 48 - 138D         | 0,244                |                   |                      |



**Figura 20.** Cultivos de bacterias nativas según su adaptación a concentraciones crecientes de nitrato de plomo

**Tabla 8.** Características diferenciales de bacterias nativas resistentes a 600 ppm de plomo

| <b>Características</b>       | <b><i>Acinetobacter</i> sp.19B</b> | <b><i>Pseudomonas</i> sp.23D</b> | <b><i>Burkholderia</i> sp.60D</b> |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Células                      | Bacilos rectos                     | Bacilos rectos                   | Bacilos rectos                    |
| Tinción de Gram              | -                                  | -                                | -                                 |
| Motilidad                    | -                                  | +                                | +                                 |
| Oxidasa                      | -                                  | +                                | +                                 |
| Catalasa                     | +                                  | +                                | +                                 |
| Descarboxilación de arginina | -                                  | +                                | +                                 |
| Hidrólisis de la gelatina    | -                                  | -                                | +                                 |
| Hidrólisis de la esculina    | -                                  | -                                | +                                 |
| Reducción de nitratos        | -                                  | +                                | -                                 |
| Descarboxilación de lisina   | +                                  | -                                | +                                 |
| Polimixina B (300UI)         | ND                                 | S                                | R                                 |
| Penicilina                   | R                                  | ND                               | ND                                |
| Oxido – fermentación:        |                                    |                                  |                                   |
| ▪ Glucosa                    | +                                  | +                                | +                                 |
| ▪ Maltosa                    | +                                  | -                                | +                                 |
| ▪ Manitol                    | -                                  | +                                | +                                 |
| ▪ Sacarosa                   | -                                  | -                                | +                                 |
| ▪ Xilosa                     | +                                  | +                                | +                                 |

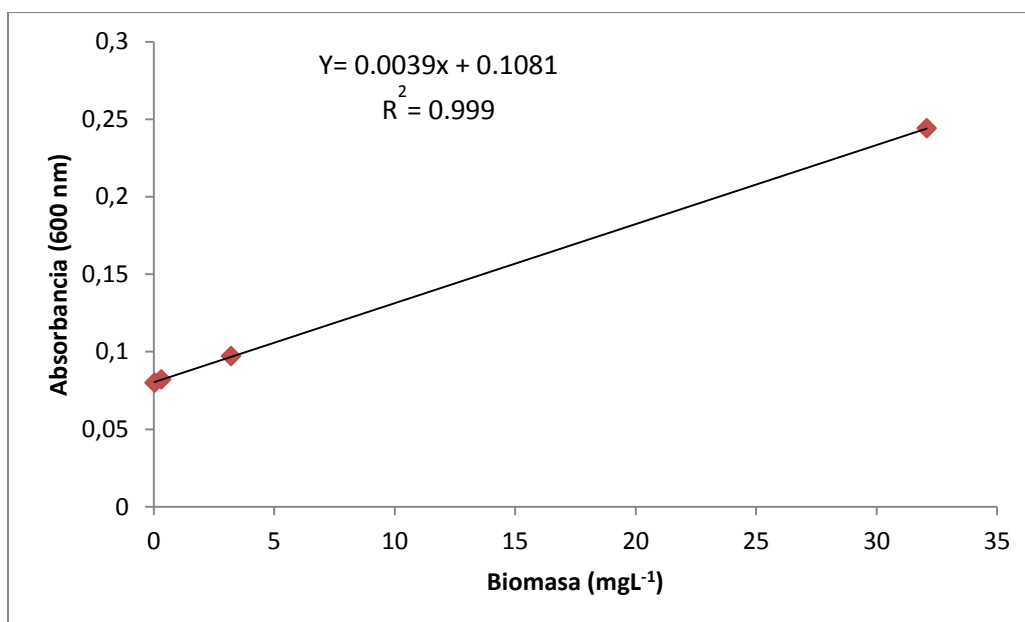
\* (+) positivo; (-) negativo.

\* (R) resistente; (S) sensible.

\*(ND) no determinado.

**Tabla 9.** Valores de absorbancia (600 nm) de biomasa de *Acinetobacter* sp.19B

| Biomasa<br>(mgL <sup>-1</sup> ) | Absorbancia<br>(600 nm) |
|---------------------------------|-------------------------|
| 32,54                           | 0,235                   |
| 3,254                           | 0,121                   |
| 0,325                           | 0,109                   |
| 0,033                           | 0,108                   |

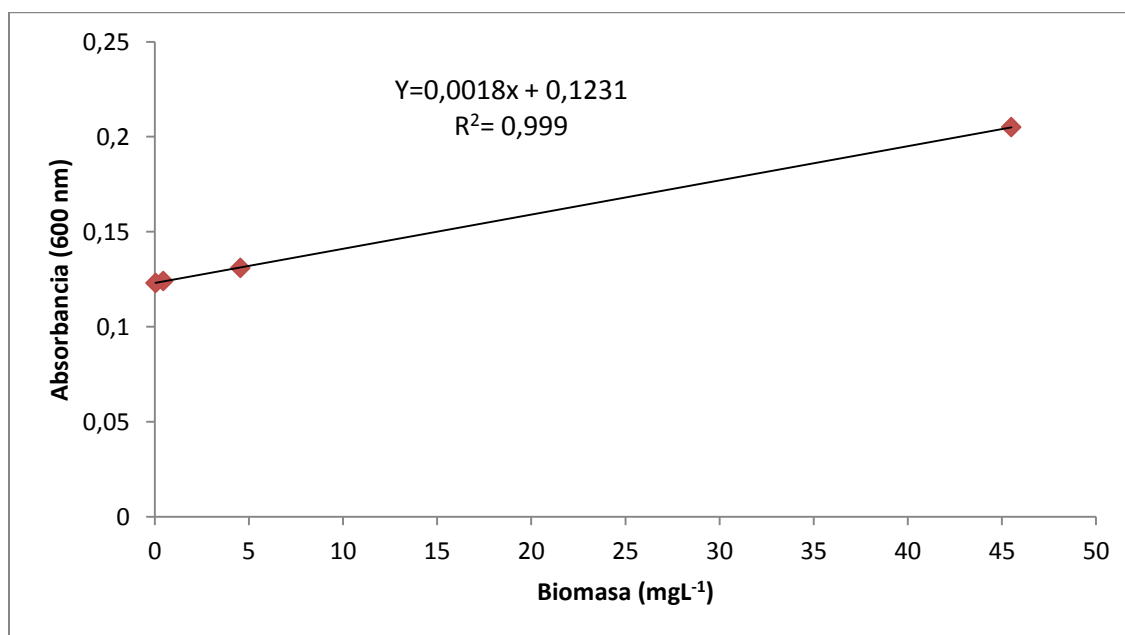


**Figura 21.** Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de *Acinetobacter* sp.19B



**Tabla 10.** Valores de absorbancia (600 nm) de biomasa de *Pseudomonas* sp.23D

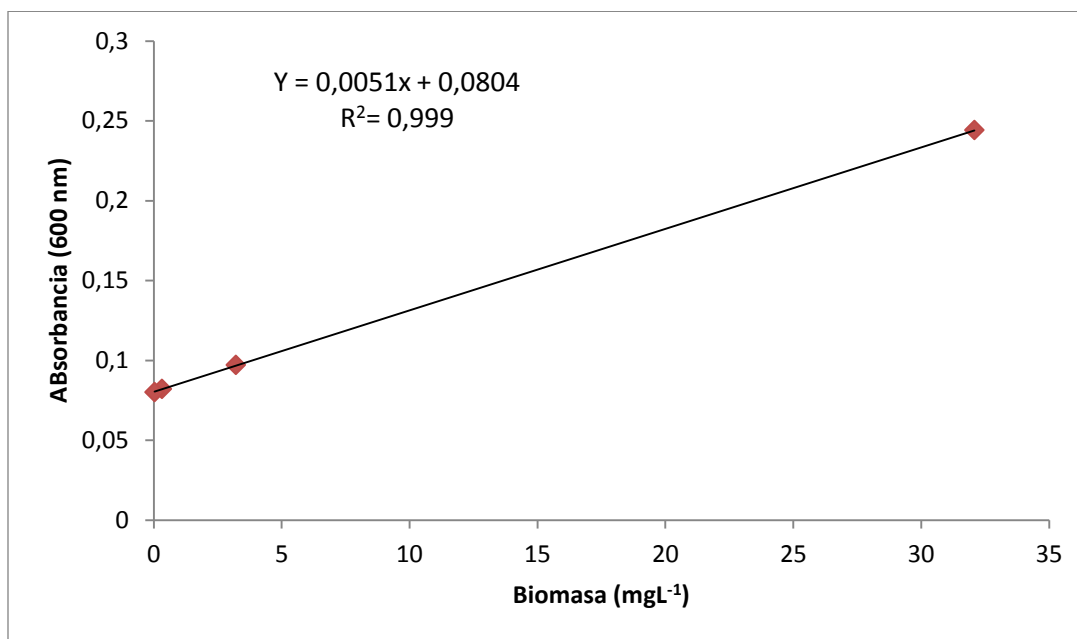
| Biomasa<br>(mgL <sup>-1</sup> ) | Absorbancia<br>(600 nm) |
|---------------------------------|-------------------------|
| 45,50                           | 0,205                   |
| 4,550                           | 0,131                   |
| 0,455                           | 0,124                   |
| 0,046                           | 0,123                   |



**Figura 22.** Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de *Pseudomonas* sp.23D

**Tabla 11.** Valores de absorbancia (600 nm) de biomasa de *Burkholderia* sp.60D

| Biomasa<br>(mgL <sup>-1</sup> ) | Absorbancia<br>(600 nm) |
|---------------------------------|-------------------------|
| 32,08                           | 0,244                   |
| 3,208                           | 0,097                   |
| 0,321                           | 0,082                   |
| 0,032                           | 0,080                   |



**Figura 23.** Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de *Burkholderia* sp.60D

#### **4.4.2 Biomasa formada por bacterias resistentes al plomo**

Los valores de la concentración de biomasa de las bacterias nativas resistentes a 600 ppm oscilaron entre 0 y 45,50 mgL<sup>-1</sup> a las 12 y 96 horas, respectivamente (Tabla 12). El mayor valor de biomasa correspondió a *Pseudomonas* sp.23D (45,50 mgL<sup>-1</sup>), seguido de *Acinetobacter* sp.19B (32,54 mgL<sup>-1</sup>) y *Burkholderia* sp.60D (32,08 mgL<sup>-1</sup>).

#### **4.4.3 Eficiencia de la remoción de plomo por bacterias nativas**

La eficiencia de la remoción de plomo por bacterias nativas fue de 83,2% con *Pseudomonas* sp.23D; 66,8% con *Acinetobacter* sp.19B y 63,3% con *Burkholderia* sp.60D (Tabla 13).

**Tabla 12.** Concentración ( $\text{mgL}^{-1}$ ) de biomasa de bacterias nativas en caldo infusión cerebro corazón con 600 ppm de plomo

| Tiempo (Horas) | Biomasa ( $\text{mgL}^{-1}$ ) |                             |                            |
|----------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|                | <i>Pseudomonas</i> sp.23D     | <i>Acinetobacter</i> sp.19B | <i>Burkholderia</i> sp.60D |
| 12             | 0                             | 0                           | 0,1                        |
| 24             | 5,50                          | 5,10                        | 6,2                        |
| 36             | 12,16                         | 14,07                       | 15,61                      |
| 48             | 18,83                         | 20,23                       | 20,31                      |
| 60             | 25,50                         | 23,31                       | 25,02                      |
| 72             | 32,17                         | 26,38                       | 27,37                      |
| 84             | 38,83                         | 29,96                       | 29,73                      |
| 96             | 45,50                         | 32,54                       | 32,08                      |

**Tabla 13.** Parámetros cinéticos de la remoción de plomo en agua residual sintética por *Acinetobacter* sp.19B, *Pseudomonas* sp.23D y *Burkholderia* sp.60D

| Parámetros                           | <i>Pseudomonas</i> sp. 23D | <i>Acinetobacter</i> sp. 19B | <i>Burkholderia</i> sp. 60D |
|--------------------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Plomo inicial ( $\text{mgL}^{-1}$ )  | 600                        | 600                          | 600                         |
| Plomo final ( $\text{mgL}^{-1}$ )    | 101                        | 199                          | 220                         |
| Plomo removido ( $\text{mgL}^{-1}$ ) | 499                        | 401                          | 380                         |
| Eficiencia (%)                       | 83,2                       | 66,8                         | 63,3                        |

## **V. DISCUSIÓN**

Para obtener bacterias resistentes al plomo se colectaron muestras de aguas residuales, coincidiendo con Moraga *et al.* (2003). Contaminantes como el plomo son descargados en la atmósfera y en los ambientes terrestres y acuáticos, por sectores como el parque automotriz que consume baterías en las que se usa plomo. Asimismo, el área de recubrimientos con óxidos y sales de plomo, la industria del vidrio, tintes de cabello, cañerías antiguas y soldaduras de plomo también generan residuos con el metal pesado y en todos los casos son evacuados por el desagüe (Ubillus, 2003).

Las bacterias de las muestras de agua residual se enriquecieron con 50 ppm de plomo para reducir al máximo o eliminar las bacterias no resistentes a este metal pesado, coincidiendo con Garza (2005) y López (2011). Se consideraron bacterias resistentes al plomo aquellas que desarrollaron en agar mas el contaminante después de dos subcultivos, teniendo en cuenta que los subcultivos disminuyen gradualmente y eliminan los microorganismos heterótrofos provenientes de las aguas residuales, asegurando la permanencia del microorganismo investigado o bacterias resistentes al plomo en la presente investigación (Guerrero, 2006).

En muestras de aguas residuales con 50 ppm de plomo se aislaron bacterias resistentes al plomo, coincidiendo con Moraga *et al.* (2003), quienes colectaron muestras de agua en estaciones cercanas a la descarga de efluentes industriales. La presencia de metales pesados en el ambiente, ejerce una fuerte presión de selección sobre los organismos y si la descarga del contaminante es permanente, como sucede habitualmente con los metales pesados, se produce una selección de genotipos resistentes. En este contexto, también se aislaron bacterias resistentes al plomo de la rizósfera de *Cynodon dactylon* colectada en una zona con vertimientos de residuos de una empresa de cerámica (Sánchez, 2008), biomasa en compostaje (López, 2011), suelo y lodos industriales (Soto *et al.*, 2010) y suelo contaminado con hidrocarburos (Mendoza *et al.*, 2010)

La interacción metal-microorganismo depende del estado de oxidación del metal y el compuesto que esté conformando. Un microorganismo puede movilizar o inmovilizar un metal. En la inmovilización, el metal pasa del estado soluble inicial en fase acuosa a una insoluble final en fase sólida (Rittmann & Mc Carty, 2001). De esta manera la biosorción es el proceso pasivo, metabólicamente no activo, de unión de iones metálicos a la superficie celular de diversos microorganismos como algas, hongos y bacterias. Los mecanismos involucrados son la adsorción, intercambio iónico, complejación, quelación y la microprecipitación (Esteban, 2013) Se ha demostrado la biosorción en bacterias (Moraga *et al.*, 2003; Sánchez, 2008; Mendoza *et al.*, 2010; Soto *et al.*, 2010), pero también en hongos filamentosos (Hernández, 2011; López, 2011) y levaduras (Gutiérrez *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008).

Para el aislamiento de bacterias resistentes al plomo se utilizaron disoluciones preparadas con una solución de plomo  $Pb(NO_3)_2$ , coincidiendo con Gutiérrez *et al.* (2008), Garza (2005), Rodríguez *et al.* (2008) y Esteban (2013). El pH de los medios de cultivo con plomo se ajustó a 5,0 por cuanto a pH inferior se favorece la solvatación del catión metálico y a pH cercano a 7,0 y mayor a 7,0 el plomo precipita por los  $OH^-$  en el medio (Gutiérrez *et al.*, 2008). Al respecto, Rodríguez *et al.* (2008) determinaron que el pH fue la variable con mayor influencia en el proceso de biosorción de plomo por biomasa de *Saccharomyces*

*cerevisiae* residual, alcanzándose el mayor porcentaje de retención a pH 5,0. Según estos investigadores el pH afecta los iones en solución, pero también los grupos funcionales de la pared celular de los microorganismos. A pH menor de 5,0 los  $H^+$  compiten con el ion  $Pb^{2+}$  por los sitios activos de la superficie celular. El estado iónico de los ligandos como los grupos carboxilo, hidroxilo y fosfato de la pared celular promueve la atracción de los iones metálicos. La interacción entre los iones metálicos y la pared celular es aparentemente de naturaleza electrostática y se ve afectado por el pH de la solución (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Las bacterias Gram negativas resistentes al plomo predominaron frente a las Gram positivas, coincidiendo con Moraga *et al.* (2003), quienes reportaron formas Gram negativas no fermentadoras en bacterias resistentes al cromo y plomo, aisladas de aguas con descargas de efluentes domésticos e industriales. Por el contrario, Soto *et al.* (2010) determinaron que la bacteria Gram positiva *Micrococcus* sp. predominó después del enriquecimiento selectivo de bacterias con los metales  $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ .

Las bacterias nativas resistieron hasta 600 ppm de plomo superando 100 ppm reportados por Mendoza *et al.* (2010) para *Chromobacterium violaceum* y *Burkholderia cepacia*. Por el contrario, Esteban (2013) reportó dos cepas de *Lactobacillus keffir* capaces de sobrevivir en presencia de 2071,9 ppm de plomo; sin cambios significativos en la biomasa después de 76 horas. Según Cárdenas *et al.* (2010) los microorganismos con potencial de adaptación a ambientes extremos presentan mecanismos de resistencia por lo que son de gran interés, con la perspectiva de su posible aplicación y uso de su biomasa para eliminar metales pesados de ambientes acuáticos impactados. La relación contaminante – microorganismo origina procesos adaptativos que finalmente se expresan como mecanismos de resistencia al contaminante (Moraga *et al.*, 2003).

Para obtener bacterias resistentes a concentraciones crecientes de plomo se cuantificó la biomasa, coincidiendo con Rodríguez *et al.* (2008), quienes demostraron que la biosorción de plomo por *Saccharomyces cerevisiae* fue favorecida por incrementos en la concentración de biomasa, debido a que también aumentó la disponibilidad de sitios activos para la retención de los iones

metálicos. No obstante, Gutiérrez *et al.* (2008) determinaron que después de un rango de concentración celular, la tasa máxima de retención de plomo es independiente de la concentración. Estos investigadores determinaron que 100 % de plomo en solución fue retenido por la biomasa cuando  $C_i/X_o$  fue menor a 0,25; mientras que las células se encontraron completamente saturadas cuando  $C_i/X_o$  fue mayor a 1,0.

En la literatura también se encontraron representantes de bacterias que resistieron más de 600 ppm de plomo. En este contexto, Moraga *et al.* (2003) determinaron que *Pseudomonas* sp. y *Alcaligenes* sp. presentaron resistencia a 3200 ppm de plomo, e inclusive a dos, tres y cuatro metales como el arsénico, cobre y níquel además del plomo. Los organismos presentan variada respuesta a los iones tóxicos de un metal, como resultado de mecanismos intrínsecos o inducidos. La tolerancia es la capacidad que tiene un organismo de vivir frente a la toxicidad de los metales a través de las propiedades intrínsecas del mismo. La resistencia es la habilidad de vivir con los metales tóxicos a través de mecanismos de detoxificación, producidos en respuesta a la presencia del metal (Labrenz *et al.*, 2000).

El porcentaje de bacterias que evidenciaron crecimiento por espectrometría disminuyó conforme se incrementó la concentración de plomo. Este resultado sugiere la presencia de determinantes genéticos que confieren resistencia a las células bacterianas, habiéndose confirmado la presencia de ADN extracromosomal en cepas resistentes a metales pesados (Mondaca *et al.*, 1993).

La mayor eficiencia de remoción de plomo de agua residual sintética se alcanzó con *Pseudomonas* sp.23D, coincidiendo con Moraga *et al.* (2003) y Mendoza *et al.*(2010). En la presente investigación se alcanzó 83,2% de eficiencia en la remoción de plomo, correspondiente a 499 ppm de plomo removido, superando 80 ppm reportado por Mendoza *et al.* (2010) para *P. putida* y *P. mendocina*. En este contexto, *Pseudomonas* sp.23D, *Acinetobacter* sp.19B y *Burkholderia* sp.60D son promisorias para la remoción de plomo de efluentes contaminados.



## VI. CONCLUSIONES

- En aguas residuales del Dren 4000 se aislaron bacterias con resistencia natural al plomo.
- Las bacterias nativas se adaptaron a concentraciones crecientes (50 – 600 ppm) de plomo.
- Las bacterias con resistencia a la mayor concentración de plomo (600 ppm) se identificaron como *Pseudomonas* sp.23D, *Acinetobacter* sp.19B y *Burkholderia* sp.60D.
- La eficiencia de la remoción de plomo en agua residual sintética fue de 83,2% con *Pseudomonas* sp.23D; 66,8% con *Acinetobacter* sp.19B y 63,3% con *Burkholderia* sp.60D.

## VII. RECOMENDACIONES

- Investigar el mecanismo de remoción de plomo por *Pseudomonas* sp.23D, *Acinetobacter* sp.19B y *Burkholderia* sp.60D.
- Caracterizar a nivel molecular *Pseudomonas* sp.23D, *Acinetobacter* sp.19B y *Burkholderia* sp.60D.

## VIII. RESUMEN

El plomo es considerado un metal pesado con potencial para dañar el ambiente y elevada resistencia a la biodegradación. Con el objetivo de determinar la eficiencia de la remoción de plomo por bacterias se colectaron 54 muestras de aguas residuales del Dren 4000 de Lambayeque. Las muestras se enriquecieron en caldo infusión cerebro corazón con 50 ppm de plomo, aislándose 475 cultivos de bacterias con resistencia natural al plomo. Las bacterias se adaptaron a concentraciones crecientes de plomo (50 - 100 - 200 - 400 - 600 ppm), cultivándolas en caldo infusión cerebro corazón suplementado con  $\text{Pb}(\text{NO}_3)^{+2}$ . Se seleccionaron *Pseudomonas* sp.23D, *Acinetobacter* sp.19B y *Burkholderia* sp.60D por su resistencia a 600 ppm de plomo. Estas bacterias se cultivaron en biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente, con 300 mL de agua residual sintética-600 ppm de plomo, determinándose la eficiencia de remoción de plomo: 83,2% con *Pseudomonas* sp.23D; 66,8% con *Acinetobacter* sp.19B y 63,3% con *Burkholderia* sp.60D. Se demostró el potencial de bacterias nativas para remover plomo de efluentes contaminados.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación*. Lambayeque, Perú: Editorial Ciencias.
- Asociación Interamericana para la Defensa del Ambiente, AIDA. (2005) *Desarrollo de un Plan de Intervención Integral para Reducir la Exposición al Plomo y otros Contaminantes en el Centro Minero de La Oroya, Perú*. Atlanta.
- Brenner, D., Garrity, M., Krieg, N., Staley, J., Boone, D. & De Vos, P. (2004). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria, Part B: The Gamma proteobacteria*. 2(2) Estados Unidos: Editorial Springer.
- Cañizares, R. (2000) Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(131), 131-143.
- Cárdenas, D., Garrido, M., Bonilla, R. & Baldani, L. (2010) Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33,285-300.
- Chambergo, C. & Herrera, P. (2009) *Efecto de la concentración de sustrato, agitación y tiempo en la degradación fotocatalítica, biodegradación y "Proceso Acoplado" de cianuro en laboratorio. Dren 4000, Lambayeque*. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Coyne, M. (2000) *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. España: Editorial Paraninfo.
- Cuizano, N. & Navarro, A. (2008) Biosorción de metales pesados por algas marinas: posible solución a bajas concentraciones. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 104 (2), 120-125.
- Esteban O. (2013) *Interacción de Lactobacillus kefir con plomo, cadmio, zinc y níquel: Análisis estructural y estudio de la capacidad secuestrante a nivel molecular*. [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina.
- Flores, J., Arrascue, M., Tapia, N. & Maldonado, H. (2001). Biorremediación de metales tóxicos en efluentes mineros aplicando biosorción. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 4(46), 46-51.
- Garza M. (2005). *Aislamiento de microorganismos con alta capacidad d tolerar y remover Pb(II), Cr(VU), Cd(II), Zn(II) y Ni(II)*. [Tesis Doctoral]. Universidad de la Habana, Ciudad de La Habana, Cuba.
- Guerrero G. (2006). *Capacidad degradativa de policlorobifenilo (PCB) por bacterias aisladas de aguas residuales del Dren 4000 de Lambayeque. Abril – Julio 2004*. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Gutiérrez, M., González, L., Sánchez E. & Mellado, D. (2008) *Biosorción de Pb<sup>2+</sup> por biomasa de Saccharomyces cerevisiae*. México: Ecatepec.
- Henry J. (2000) An overview of the phytoremediation of lead and mercury. Washington, D.C: *National Network of Environmental Management Studies (NNEMS)*.
- Hernández S. (2011) *Propuesta de un sistema de lixiviación-biosorción con hongos filamentosos para la biorremediación de matrices contaminadas con plomo*. [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

- Hernández, M. & Wegner, S. (2002) *Estudio demográfico de salud de niños intoxicados por plomo tercer dosaje A.A. H.H. "Puerto Nuevo"- Callao. Perú: Dirección General de Salud Ambiental.*
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2003) *Metodología de la Investigación.* México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A.
- Hurtado, A. & Guzmán C. (2011) *Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de Solanum tuberosum* [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Labrenz, M., Tindall, B., Lawson, P., Collins, M., Human & Hirsh, P. (2000) *Staleyia guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov.,  $\alpha$ -3-Proteobacteria from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho Lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 303-313.
- López M. (2011) *Biorremediación de metales pesados con aislados microbianos procedentes de procesos de compostaje.* [Tesis de Maestría]. Universidad de Almería, Almería, España.
- Mejía, G. (2006) Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1), 77-99.
- Mendoza, J., Perea, Y., Petrelin, C., Silveti, A., Martínez, M., Pérez, G., Espinosa, B. & Arriola, J. (2010) Biosorción de cromo, arsénico y plomo de soluciones acuosas por cultivos bacterianos en suspensión. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 1(2), 67-73.
- Mondaca, M., Abarzúa, M., Paredes, K., Maugeri, T. & Martínez, M. (1993) Transferencia de resistencia a metales pesados en bacterias aisladas del río Bío Bío, VII Región, Chile. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 35,39-43.
- Moraga, R., Merino, C. & Mondaca M. (2003) Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigaciones Marinas*, 31(1),91-95.

- Pebe, G., Villa, H., Escate, L. & Cervantes, G. (2008) Niveles de plomo sanguíneo en recién nacidos de La Oroya, 2004-2005. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25 (4), 355-360.
- Ramos, W., Munive, L., Alfaro, M., Calderón, M., Gonzáles, I. & Núñez Y. (2009) Intoxicación plúmbica crónica: una revisión de la problemática ambiental en el Perú. *Revista Peruana de Epidemiología*, 13 (2), 1-8.
- Richmond, A. (2004) *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Oxford, United Kingdom: Blackwell Science.
- Rittmann, B. & Mac Carty, P. (2011) *Biotecnología del Medio Ambiente Principios y Aplicaciones*. Mexico: Ed. Mc Graw Hill.
- Rodríguez, M., Miranda, R., Olivas, R. & Sosa, C. (2008) Efectos de las condiciones de operación sobre la Biosorción de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Cr^{3+}$  en solución por *Saccharomyces cerevisiae* residual. *Información Tecnológica*, 19(6), 47-55.
- Sánchez S. (2008) *Especies vegetales y microorganismos rizosféricos tolerantes a metales pesados de un ecosistema contaminado*. [Tesis de Maestría]. Universidad Agraria La Habana, La Habana, Cuba.
- Sheng, P., Ting, Y., Chen, J. & Hong, L. (2004) Sorption of lead, copper, cadmium, zinc and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, 131-141.
- Soto, C., Gutiérrez, Rey-León, A. & Gonzales, E. (2010) Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 8(14), 121-240.
- Ubillus J. (2003) *Estudio sobre la presencia de plomo en el medio ambiente de Talara en el año 2003*. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Mayor San Marcos, Lima, Perú.
- Vásquez L. (2006) La minería en el Perú y su problemática en Lambayeque. *UMBRAL Revista de Educación, Cultura y Sociedad FACHSE*, (11-12), 119-122.

- World Health Organization, WHO (2005). *Air Quality Guidelines Global Update 2005*. Copenhagen, Denmark: Regional Office for Europe.
- Wuana, R. & Okieimen, F. (2011) Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Network*, (2011)1-20.
- Yang, H. & Pan, G. (2002) Toxicity and bioaccumulation of copper in three microalgal species. *Chemosphere*, 49, 471-476.



## ANEXO 1

### Calculo del número de muestras de aguas residuales para el aislamiento de bacterias resistentes al plomo (Alvitres, 2000)

$$n = \frac{z^2 (p \cdot q)}{t^2}$$

Donde:

- n = tamaño de la muestra.
- z = 1,96 ( $\alpha=0,05$ ) valor estándar.
- p = prevalencia o presencia de bacterias resistentes al plomo en aguas residuales (0,90)
- q = ausencia (0,10)
- t = error permitido (0,8%)

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90 \times 0,10)}{(0,08)^2}$$

$$n = 54,02 \text{ muestras}$$

## ANEXO 2

### Caldo Infusión Cerebro Corazón (en Mendoza *et al.*, 2010)

|   |          |
|---|----------|
| Infusión de cerebro de ternera (a partir de 200 g)..... | 12,5 g   |
| Infusión de corazón de res (a partir de 250 g) ...      | 5,0 g    |
| Glucosa.....  | 2,0 g    |
| Peptona de gelatina.....                                | 10,0 g   |
| Cloruro de sodio.....                                   | 5,0 g    |
| Fosfato disódico.....                                   | 2,5 g    |
| Nitrato de plomo*.....                                  | X g      |
| Agua destilada.....                                     | 1 000 mL |
| pH final:7,4 ±0,2                                       |          |

\* La cantidad de nitrato de plomo depende de la concentración final requerida para la solución.

### ANEXO 3

#### **Preparación de caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI) a diferentes concentraciones de nitrato de plomo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)^{+2}$ ) a partir de una solución stock de 1000 ppm**

Cantidad de plomo necesaria para preparar 0,5 mL de nitrato de plomo a 1000 ppm:

$$\text{ppm} = \frac{\text{Masa de soluto (mg)}}{\text{Volumen de solución (L)}} \qquad 1000 = \frac{\text{Cantidad de plomo (mg)}}{0,5 \text{ L}}$$

Cantidad de plomo = 500 mg.

El peso molecular del  $\text{Pb}(\text{NO}_3)^{+2}$  es 331,2 mg y contiene 207,2 mg de plomo; entonces:

$$\begin{array}{r} 331,2 \text{ mg Pb}(\text{NO}_3)^{+2} \rightarrow 207,2 \text{ mg Pb} \\ X \text{ mg Pb}(\text{NO}_3)^{+2} \rightarrow 500 \text{ mg Pb} \\ \hline X \text{ mg Pb}(\text{NO}_3)^{+2} \rightarrow 800 \text{ mg Pb} \end{array}$$

Para preparar una solución stock de 1000 ppm de plomo pesar 800 mg de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)^{+2}$  y diluir en ácido acético hasta completar 500 mL.

Luego:

$$1 \text{ ppm} = 1 \text{ mgL}^{-1}$$

➤ Concentración 1 =  $50 \text{ mgL}^{-1}$

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \cdot V_1 = 50 \text{ mgL}^{-1} \cdot 50 \text{ mL}$$

$$1000 \text{ ppm} \cdot V_1 = 50 \text{ ppm} \cdot 50 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{50 \text{ ppm} \cdot 50 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL}$$

- Para obtener una concentración de 50 ppm de plomo, tomar 2,5 mL de la solución stock y aforar a 50 mL con caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI).

\*Con esta misma fórmula obtener las concentraciones de plomo requeridas para suplementar los medios de cultivo utilizados durante la investigación.

#### ANEXO 4

**Preparación de caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI) suplementado con concentraciones crecientes de plomo (para 0,5L)**

| <b>Concentración<br/>requerida<br/>(ppm)</b> | <b>Solución stock 1000<br/>ppm<br/>(mL)</b> | <b>Caldo infusión cerebro<br/>corazón<br/>(mL)</b> |
|--|---|--|
| 100  | 50  | 450  |
| 200  | 100   | 400  |
| 400  | 200   | 300  |
| 600  | 300   | 200  |

## ANEXO 5

### Caracterización morfológica macroscópica y microscópica de bacterias aisladas de aguas residuales

| Bacteria - Código | Tamaño  | Color       | Elevación | Contorno  | Tinción       |
|-------------------|---------|-------------|-----------|-----------|---------------|
| 1 - 1A            | Grande  | Blanca      | Plana     | Irregular | Gram negativa |
| 2 - 2A            | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 3 - 3A            | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 4 - 4A            | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 5 - 5A            | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 6 - 6A            | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 7 - 7A            | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 8 - 8A            | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 9 - 9A            | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 10 - 10A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 11 - 11A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 12 - 12A          | Grande  | Translúcida | Plana     | Entero    | Gram positiva |
| 13 - 13A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 14 - 14A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 15 - 15A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 16 - 16A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 17 - 17A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 18 - 18A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 19 - 19A          | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 20 - 20A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 21 - 21A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 22 - 22A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 23 - 23A          | Mediana | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 24 - 24A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 25 - 25A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 26 - 26A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 27 - 27A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 28 - 28A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 29 - 19A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 30 - 30A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 31 - 31A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 32 - 32A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 33 - 33A          | Mediana | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 34 - 34A          | Mediana | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 35 - 35A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 36 - 36A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 37 - 37A          | Grande  | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 38 - 38A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 39 - 39A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |

Continuación...

| Bacteria - Código | Tamaño  | Color       | Elevación | Contorno  | Tinción       |
|-------------------|---------|-------------|-----------|-----------|---------------|
| 40 - 40A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 41 - 41A          | Grande  | Translúcida | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 42 - 42A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 43 - 43A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 44 - 44A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 45 - 45A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 46 - 46A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 47 - 47A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 48 - 48A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 49 - 49A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 50 - 50A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 51 - 51A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 52 - 52A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 53 - 53A          | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 54 - 54A          | Mediana | Roja        | Plana     | Entero    | Gram negativa |
| 55 - 55A          | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 56 - 56A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 57 - 57A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 58 - 58A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 59 - 59A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 60 - 60A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 61 - 61A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 62 - 62A          | Grande  | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 63 - 63A          | Mediana | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 64 - 64A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 65 - 65A          | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 66 - 66A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 67 - 67A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 68 - 68A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 69 - 69A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 70 - 70A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 71 - 71A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 72 - 72A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 73 - 73A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 74 - 74A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 75 - 75A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 76 - 76A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 77 - 77A          | Mediana | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 78 - 78A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 79 - 79A          | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |

Continuación...

| Bacteria - Código | Tamaño  | Color       | Elevación | Contorno  | Tinción       |
|-------------------|---------|-------------|-----------|-----------|---------------|
| 80 - 80A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 81 - 81A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 82 - 82A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 83 - 83A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 84 - 84A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 85 - 85A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 86 - 86A          | Mediana | Cremosa     | Plana     | Entero    | Gram negativa |
| 87 - 87A          | Grande  | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 88 - 88A          | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 89 - 89A          | Grande  | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 90 - 90A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 91 - 91A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 92 - 92A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 93 - 93A          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 94 - 94A          | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 95 - 1B           | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 96 - 2B           | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 97 - 3B           | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 98 - 4B           | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 95 - 5B           | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 100 - 6B          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 101 - 7B          | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 102 - 8B          | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 103 - 9B          | Grande  | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 104 - 10B         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 105 - 11B         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 106 - 12B         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 107 - 13B         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 108 - 14B         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 109 - 15B         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 110 - 16B         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 111 - 17B         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 112 - 18B         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 113 - 19B         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 114 - 20B         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 115 - 21B         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 116 - 22B         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 117 - 23B         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 118 - 24B         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 119 - 25B         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |

Continuación...

| Bacteria - Código | Tamaño  | Color    | Elevación | Contorno  | Tinción       |
|-------------------|---------|----------|-----------|-----------|---------------|
| 120 - 26B         | Mediana | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 121 - 27B         | Pequeña | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 122 - 28B         | Grande  | Blanca   | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 123 - 29B         | Mediana | Blanca   | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 124 - 30B         | Grande  | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 125 - 31B         | Mediana | Blanca   | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 126 - 32B         | Grande  | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 127 - 33B         | Mediana | Blanca   | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 128 - 34B         | Pequeña | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 129 - 35B         | Pequeña | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 130 - 36B         | Grande  | Blanca   | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 131 - 37B         | Mediana | Blanca   | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 132 - 38B         | Grande  | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 133 - 39B         | Pequeña | Blanca   | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 134 - 40B         | Pequeña | Cremospa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 135 - 41B         | Mediana | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 136 - 42B         | Mediana | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 137 - 43B         | Grande  | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 138 - 44B         | Pequeña | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 139 - 45B         | Pequeña | Blanca   | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 140 - 46B         | Mediana | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 141 - 47B         | Mediana | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 142 - 48B         | Grande  | Blanca   | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 143 - 49B         | Mediana | Blanca   | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 144 - 50B         | Mediana | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 145 - 51B         | Grande  | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 146 - 52B         | Grande  | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 147 - 53B         | Mediana | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 148 - 54B         | Pequeña | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 149 - 55B         | Pequeña | Blanca   | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 150 - 56B         | Mediana | Blanca   | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 151 - 57B         | Mediana | Cremosa  | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 152 - 58B         | Mediana | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 153 - 59B         | Grande  | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 154 - 60B         | Mediana | Blanca   | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 155 - 61B         | Grande  | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 156 - 62B         | Grande  | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 157 - 63B         | Mediana | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 158 - 64B         | Pequeña | Cremosa  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 159 - 65B         | Grande  | Blanca   | Plana     | Entero    | Gram negativa |



Continuación...

| Bacteria - Código | Tamaño  | Color   | Elevación | Contorno  | Tinción       |
|-------------------|---------|---------|-----------|-----------|---------------|
| 160 - 66B         | Grande  | Blanca  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 161 - 67B         | Pequeña | Blanca  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 162 - 68B         | Grande  | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 163 - 69B         | Pequeña | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 164 - 70B         | Pequeña | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 165 - 71B         | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 166 - 72B         | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 167 - 73B         | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 168 - 74B         | Mediana | Blanca  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 169 - 75B         | Pequeña | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 170 - 76B         | Pequeña | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 171 - 77B         | Mediana | Cremosa | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 172 - 78B         | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 173 - 79B         | Grande  | Blanca  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 174 - 80B         | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 175 - 81B         | Pequeña | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 176 - 82B         | Pequeña | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 177 - 83B         | Pequeña | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 178 - 84B         | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 179 - 85B         | Grande  | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 180 - 86B         | Pequeña | Blanca  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 181 - 87B         | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 182 - 88B         | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 183 - 89B         | Mediana | Blanca  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 184 - 90B         | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 185 - 1C          | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 186 - 2C          | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 187 - 3C          | Grande  | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 188 - 4C          | Mediana | Cremosa | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 189 - 5C          | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 190 - 6C          | Grande  | Cremosa | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 191 - 7C          | Pequeña | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 192 - 8C          | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 193 - 9C          | Mediana | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 194 - 10C         | Pequeña | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 195 - 11C         | Pequeña | Cremosa | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 196 - 12C         | Mediana | Blanca  | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 197 - 13C         | Pequeña | Cremosa | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 198 - 14C         | Mediana | Blanca  | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 199 - 15C         | Grande  | Cremosa | Convexa   | Irregular | Gram negativa |

Continuación...

| Bacteria - Código | Tamaño  | Color       | Elevación | Contorno  | Tinción       |
|-------------------|---------|-------------|-----------|-----------|---------------|
| 200 - 16C         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 201 - 17C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 202 - 18C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 203 - 19C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 204 - 20C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 205 - 21C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 206 - 22C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 207 - 23C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 208 - 24C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 209 - 25C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 210 - 26C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 211 - 27C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 212 - 28C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 213 - 29C         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 214 - 30C         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 215 - 31C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 216 - 32C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 217 - 33C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 218 - 34C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 219 - 35C         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 220 - 36C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 221 - 37C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 222 - 38C         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 223 - 39C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 224 - 40C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 225 - 41C         | Mediana | Translúcida | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 226 - 42C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 227 - 43C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 228 - 44C         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 229 - 45C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 230 - 46C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 231 - 47C         | Pequeña | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 232 - 48C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 233 - 49C         | Mediana | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 234 - 50C         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 235 - 51C         | Pequeña | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 236 - 52C         | Pequeña | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 237 - 53C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 238 - 54C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 239 - 55C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |

Continuación...

| Bacteria - Código | Tamaño  | Color       | Elevación | Contorno  | Tinción       |
|-------------------|---------|-------------|-----------|-----------|---------------|
| 240 - 56C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 241 - 57C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 242 - 58C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 243 - 59C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 244 - 60C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 245 - 61C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 246 - 62C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 247 - 63C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 248 - 64C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 249 - 65C         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 250 - 66C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 251 - 67C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 252 - 68C         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 253 - 69C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 254 - 70C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 255 - 71C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 256 - 72C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 257 - 73C         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 258 - 74C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 259 - 75C         | Pequeña | Translúcida | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 260 - 76C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 261 - 77C         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 262 - 78C         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 263 - 79C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 264 - 80C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 265 - 81C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 266 - 82C         | Mediana | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 267 - 83C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 268 - 84C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 269 - 85C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 270 - 86C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 271 - 87C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 272 - 88C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 273 - 89C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 274 - 90C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 275 - 91C         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 276 - 92C         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 277 - 93C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 278 - 94C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 279 - 95C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |

Continuación...

| Bacteria - Código | Tamaño  | Color       | Elevación | Contorno  | Tinción       |
|-------------------|---------|-------------|-----------|-----------|---------------|
| 280 - 96C         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 281 - 97C         | Grande  | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 282 - 98C         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 283 - 99C         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 284 - 100C        | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 285 - 101C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 286 - 102C        | Pequeña | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 287 - 103C        | Mediana | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 288 - 104C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 289 - 105C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 290 - 106C        | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 291 - 107C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 292 - 108C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 293 - 109C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 294 - 110C        | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 295 - 111C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 296 - 112C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 297 - 113C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 298 - 114C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 299 - 115C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 300 - 116C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 301 - 117C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 302 - 118C        | Mediana | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 303 - 119C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 304 - 120C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 305 - 121C        | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 306 - 122C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 307 - 123C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 308 - 124C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 309 - 125C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 310 - 126C        | Mediana | Translúcida | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 311 - 127C        | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 312 - 128C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 313 - 129C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 314 - 130C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 315 - 131C        | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 316 - 132C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 317 - 133C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 318 - 134C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 319 - 135C        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |

Continuación...

| Bacteria - Código | Tamaño  | Color       | Elevación | Contorno  | Tinción       |
|-------------------|---------|-------------|-----------|-----------|---------------|
| 320 - 136C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 321 - 137C        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 322 - 138C        | Pequeña | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 323 - 139C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 324 - 140C        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 325 - 1D          | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 326 - 2D          | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 327 - 3D          | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 328 - 4D          | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 329 - 5D          | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 330 - 6D          | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 331 - 7D          | Mediana | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 332 - 8D          | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 333 - 9D          | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 334 - 10D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 335 - 11D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 336 - 12D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 337 - 13D         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 338 - 14D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 339 - 15D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 340 - 16D         | Pequeña | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 341 - 17D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 342 - 18D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 343 - 19D         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 344 - 20D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 345 - 21D         | Grande  | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 346 - 22D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 347 - 23D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 348 - 24D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 349 - 25D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 350 - 26D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 351 - 27D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 352 - 28D         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 353 - 29D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 354 - 30D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 355 - 31D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 356 - 32D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 357 - 33D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 358 - 34D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 359 - 35D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |

Continuación...

| Bacteria - Código | Tamaño  | Color       | Elevación | Contorno  | Tinción       |
|-------------------|---------|-------------|-----------|-----------|---------------|
| 360 - 36D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 361 - 37D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 362 - 38D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 363 - 39D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 364 - 40D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 365 - 41D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 366 - 42D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 367 - 43D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 368 - 44D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 369 - 45D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 370 - 46D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 371 - 47D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 372 - 48D         | Grande  | Translúcida | Plana     | Entero    | Gram negativa |
| 373 - 49D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 374 - 50D         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 375 - 51D         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 376 - 52D         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 377 - 53D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 378 - 54D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 379 - 55D         | Grande  | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 380 - 56D         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 381 - 57D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 382 - 58D         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 383 - 59D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 384 - 60D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 385 - 61D         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 386 - 62D         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 387 - 63D         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 388 - 64D         | Mediana | Amarilla    | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 389 - 65D         | Pequeña | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 390 - 66D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 391 - 67D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 392 - 68D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 393 - 69D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 394 - 70D         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 395 - 71D         | Grande  | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 396 - 72D         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 397 - 73D         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 398 - 74D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 399 - 75D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |

Continuación...

| Bacteria - Código | Tamaño  | Color       | Elevación | Contorno  | Tinción       |
|-------------------|---------|-------------|-----------|-----------|---------------|
| 400 - 76D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 401 - 77D         | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 402 - 78D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 403 - 79D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 404 - 80D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 405 - 81D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 406 - 82D         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 407 - 83D         | Pequeña | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 408 - 84D         | Pequeña | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 409 - 85D         | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 410 - 86D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 411 - 87D         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 412 - 88D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 413 - 89D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 414 - 90D         | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 415 - 91D         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 416 - 92D         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 417 - 93D         | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 418 - 94D         | Mediana | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 419 - 95D         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 420 - 96D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 421 - 97D         | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 422 - 98D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 423 - 99D         | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 424 - 100D        | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 425 - 101D        | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 426 - 102D        | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 427 - 103D        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 428 - 104D        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 429 - 105D        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 430 - 106D        | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 431 - 107D        | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 432 - 108D        | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 433 - 109D        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 434 - 110D        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 435 - 111D        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 436 - 112D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 437 - 113D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 438 - 114D        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 439 - 115D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |

Continuación...

| Bacteria - Código | Tamaño  | Color       | Elevación | Contorno  | Tinción       |
|-------------------|---------|-------------|-----------|-----------|---------------|
| 440 - 116D        | Pequeña | Blanca      | Plana     | Entero    | Gram positiva |
| 441 - 117D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 442 - 118D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 443 - 119D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 444 - 120D        | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 445 - 121D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 446 - 122D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 447 - 123D        | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 448 - 124D        | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 449 - 125D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 450 - 126D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 451 - 127D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 452 - 128D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 453 - 129D        | Pequeña | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 454 - 130D        | Grande  | Roja        | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 455 - 131D        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 456 - 132D        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 457 - 133D        | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 458 - 134D        | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 459 - 135D        | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 460 - 136D        | Grande  | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 461 - 137D        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 462 - 138D        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 463 - 139D        | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 464 - 140D        | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 465 - 141D        | Grande  | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 466 - 142D        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 467 - 143D        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 468 - 144D        | Mediana | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 469 - 145D        | Pequeña | Cremosa     | Plana     | Entero    | Gram negativa |
| 470 - 146D        | Grande  | Translúcida | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 471 - 147D        | Mediana | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram negativa |
| 472 - 148D        | Grande  | Blanca      | Convexa   | Irregular | Gram positiva |
| 473 - 149D        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram positiva |
| 474 - 150D        | Pequeña | Cremosa     | Convexa   | Entero    | Gram negativa |
| 475 - 151D        | Pequeña | Blanca      | Convexa   | Entero    | Gram negativa |



## ANEXO 6

Calificación del crecimiento de bacterias nativas resistentes al plomo en agar infusión cerebro corazón con 50 ppm de plomo

| Cultivo puro | Código | Calificativo | Cultivo puro | Código | Calificativo |
|--------------|--------|--------------|--------------|--------|--------------|
| 1            | 2A     | +++          | 39           | 46B    | +++          |
| 2            | 4A     | +++          | 40           | 52B    | +++          |
| 3            | 9A     | +++          | 41           | 56B    | +++          |
| 4            | 11A    | +++          | 42           | 57B    | +++          |
| 5            | 28A    | +++          | 43           | 58B    | +++          |
| 6            | 29A    | +++          | 44           | 59B    | +++          |
| 7            | 32A    | +++          | 45           | 60B    | +++          |
| 8            | 39A    | +++          | 46           | 63B    | +++          |
| 9            | 44A    | +++          | 47           | 66B    | +++          |
| 10           | 56A    | +++          | 48           | 67B    | +++          |
| 11           | 57A    | +++          | 49           | 68B    | +++          |
| 12           | 63A    | +++          | 50           | 73B    | +++          |
| 13           | 64A    | +++          | 51           | 74B    | +++          |
| 14           | 73A    | +++          | 52           | 77B    | +++          |
| 15           | 74A    | +++          | 53           | 78B    | +++          |
| 16           | 75A    | +++          | 54           | 79B    | +++          |
| 17           | 81A    | +++          | 55           | 80B    | +++          |
| 18           | 86A    | +++          | 56           | 81B    | +++          |
| 19           | 7B     | +++          | 57           | 85B    | +++          |
| 20           | 10B    | +++          | 58           | 86B    | +++          |
| 21           | 11B    | +++          | 59           | 87B    | +++          |
| 22           | 12B    | +++          | 60           | 89B    | +++          |
| 23           | 14B    | +++          | 61           | 90B    | +++          |
| 24           | 15B    | +++          | 62           | 1C     | +++          |
| 25           | 19B    | +++          | 63           | 2C     | +++          |
| 26           | 20B    | +++          | 64           | 3C     | +++          |
| 27           | 22B    | +++          | 65           | 9C     | +++          |
| 28           | 23B    | +++          | 66           | 10C    | +++          |
| 29           | 24B    | +++          | 67           | 14C    | +++          |
| 30           | 26B    | +++          | 68           | 20C    | +++          |
| 31           | 27B    | +++          | 69           | 21C    | +++          |
| 32           | 28B    | +++          | 70           | 22C    | +++          |
| 33           | 30B    | +++          | 71           | 23C    | +++          |
| 34           | 31B    | +++          | 72           | 28C    | +++          |
| 35           | 36B    | +++          | 73           | 29C    | +++          |
| 36           | 40B    | +++          | 74           | 35C    | +++          |
| 37           | 41B    | +++          | 75           | 37C    | +++          |
| 38           | 43B    | +++          | 76           | 39C    | +++          |

Continuación...

| <b>Cultivo puro</b> | <b>Código</b> | <b>Calificativo</b> | <b>Cultivo puro</b> | <b>Código</b> | <b>Calificativo</b> |
|---------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------|---------------------|
| 77                  | 42C           | +++                 | 115                 | 140C          | +++                 |
| 78                  | 45C           | +++                 | 116                 | 1D            | +++                 |
| 79                  | 46C           | +++                 | 117                 | 2D            | +++                 |
| 80                  | 50C           | +++                 | 118                 | 8D            | +++                 |
| 81                  | 53C           | +++                 | 119                 | 12D           | +++                 |
| 82                  | 55C           | +++                 | 120                 | 19D           | +++                 |
| 83                  | 57C           | +++                 | 121                 | 22D           | +++                 |
| 84                  | 58C           | +++                 | 122                 | 23D           | +++                 |
| 85                  | 62C           | +++                 | 123                 | 24D           | +++                 |
| 86                  | 67C           | +++                 | 124                 | 25D           | +++                 |
| 87                  | 68C           | +++                 | 125                 | 28D           | +++                 |
| 88                  | 69C           | +++                 | 126                 | 29D           | +++                 |
| 89                  | 70C           | +++                 | 127                 | 33D           | +++                 |
| 90                  | 71C           | +++                 | 128                 | 35D           | +++                 |
| 91                  | 76C           | +++                 | 129                 | 36D           | +++                 |
| 92                  | 77C           | +++                 | 130                 | 37D           | +++                 |
| 93                  | 83C           | +++                 | 131                 | 38D           | +++                 |
| 94                  | 84C           | +++                 | 132                 | 40D           | +++                 |
| 95                  | 85C           | +++                 | 133                 | 42D           | +++                 |
| 96                  | 94C           | +++                 | 134                 | 43D           | +++                 |
| 97                  | 95C           | +++                 | 135                 | 44D           | +++                 |
| 98                  | 103C          | +++                 | 136                 | 45D           | +++                 |
| 99                  | 104C          | +++                 | 137                 | 46D           | +++                 |
| 100                 | 105C          | +++                 | 138                 | 47D           | +++                 |
| 101                 | 106C          | +++                 | 139                 | 48D           | +++                 |
| 102                 | 114C          | +++                 | 140                 | 49D           | +++                 |
| 103                 | 115C          | +++                 | 141                 | 50D           | +++                 |
| 104                 | 116C          | +++                 | 142                 | 51D           | +++                 |
| 105                 | 117C          | +++                 | 143                 | 52D           | +++                 |
| 106                 | 118C          | +++                 | 144                 | 53D           | +++                 |
| 107                 | 119C          | +++                 | 145                 | 54D           | +++                 |
| 108                 | 120C          | +++                 | 146                 | 55D           | +++                 |
| 109                 | 121C          | +++                 | 147                 | 56D           | +++                 |
| 110                 | 132C          | +++                 | 148                 | 57D           | +++                 |
| 111                 | 133C          | +++                 | 149                 | 58D           | +++                 |
| 112                 | 134C          | +++                 | 150                 | 59D           | +++                 |
| 113                 | 138C          | +++                 | 151                 | 60D           | +++                 |
| 114                 | 139C          | +++                 | 152                 | 61D           | +++                 |

Continuación...

| <b>Cultivo puro</b> | <b>Código</b> | <b>Calificativo</b> | <b>Cultivo puro</b> | <b>Código</b> | <b>Calificativo</b> |
|---------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------|---------------------|
| 153                 | 63D           | +++                 | 191                 | 124D          | +++                 |
| 154                 | 64D           | +++                 | 192                 | 125D          | +++                 |
| 155                 | 65D           | +++                 | 193                 | 126D          | +++                 |
| 156                 | 66D           | +++                 | 194                 | 128D          | +++                 |
| 157                 | 67D           | +++                 | 195                 | 129D          | +++                 |
| 158                 | 68D           | +++                 | 196                 | 130D          | +++                 |
| 159                 | 69D           | +++                 | 197                 | 131D          | +++                 |
| 160                 | 70D           | +++                 | 198                 | 132D          | +++                 |
| 161                 | 74D           | +++                 | 199                 | 133D          | +++                 |
| 162                 | 77D           | +++                 | 200                 | 134D          | +++                 |
| 163                 | 79D           | +++                 | 201                 | 135D          | +++                 |
| 164                 | 81D           | +++                 | 202                 | 141D          | +++                 |
| 165                 | 82D           | +++                 | 203                 | 142D          | +++                 |
| 166                 | 83D           | +++                 | 204                 | 143D          | +++                 |
| 167                 | 84D           | +++                 | 205                 | 144D          | +++                 |
| 168                 | 85D           | +++                 | 206                 | 145D          | +++                 |
| 169                 | 86D           | +++                 | 207                 | 146D          | +++                 |
| 170                 | 87D           | +++                 | 208                 | 147D          | +++                 |
| 171                 | 88D           | +++                 | 209                 | 148D          | +++                 |
| 172                 | 89D           | +++                 | 210                 | 149D          | +++                 |
| 173                 | 90D           | +++                 | 211                 | 1A            | ++                  |
| 174                 | 94D           | +++                 | 212                 | 25A           | ++                  |
| 175                 | 95D           | +++                 | 213                 | 27A           | ++                  |
| 176                 | 96D           | +++                 | 214                 | 34A           | ++                  |
| 177                 | 100D          | +++                 | 215                 | 45A           | ++                  |
| 178                 | 101D          | +++                 | 216                 | 46A           | ++                  |
| 179                 | 104D          | +++                 | 217                 | 55A           | ++                  |
| 180                 | 105D          | +++                 | 218                 | 80A           | ++                  |
| 181                 | 106D          | +++                 | 219                 | 91A           | ++                  |
| 182                 | 107D          | +++                 | 220                 | 2B            | ++                  |
| 183                 | 113D          | +++                 | 221                 | 5B            | ++                  |
| 184                 | 114D          | +++                 | 222                 | 8B            | ++                  |
| 185                 | 115D          | +++                 | 223                 | 16B           | ++                  |
| 186                 | 116D          | +++                 | 224                 | 17B           | ++                  |
| 187                 | 118D          | +++                 | 225                 | 25B           | ++                  |
| 188                 | 120D          | +++                 | 226                 | 29B           | ++                  |
| 189                 | 121D          | +++                 | 227                 | 32B           | ++                  |
| 190                 | 122D          | +++                 | 228                 | 38B           | ++                  |

Continuación...

| <b>Cultivo puro</b> | <b>Código</b> | <b>Calificativo</b> | <b>Cultivo puro</b> | <b>Código</b> | <b>Calificativo</b> |
|---------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------|---------------------|
| 229                 | 42B           | ++                  | 267                 | 93D           | ++                  |
| 230                 | 47B           | ++                  | 268                 | 102D          | ++                  |
| 231                 | 48B           | ++                  | 269                 | 111D          | ++                  |
| 232                 | 49B           | ++                  | 270                 | 112D          | ++                  |
| 233                 | 69B           | ++                  | 271                 | 127D          | ++                  |
| 234                 | 70B           | ++                  | 272                 | 140D          | ++                  |
| 235                 | 71B           | ++                  | 273                 | 150D          | ++                  |
| 236                 | 72B           | ++                  | 274                 | 3A            | +                   |
| 237                 | 82B           | ++                  | 275                 | 5A            | +                   |
| 238                 | 88B           | ++                  | 276                 | 6A            | +                   |
| 239                 | 4C            | ++                  | 277                 | 7A            | +                   |
| 240                 | 5C            | ++                  | 278                 | 8A            | +                   |
| 241                 | 13C           | ++                  | 279                 | 10A           | +                   |
| 242                 | 15C           | ++                  | 280                 | 12A           | +                   |
| 243                 | 33C           | ++                  | 281                 | 13A           | +                   |
| 244                 | 36C           | ++                  | 282                 | 14A           | +                   |
| 245                 | 48C           | ++                  | 283                 | 15A           | +                   |
| 246                 | 56C           | ++                  | 284                 | 16A           | +                   |
| 247                 | 64C           | ++                  | 285                 | 17A           | +                   |
| 248                 | 65C           | ++                  | 286                 | 18A           | +                   |
| 249                 | 66C           | ++                  | 287                 | 19A           | +                   |
| 250                 | 79C           | ++                  | 288                 | 20A           | +                   |
| 251                 | 80C           | ++                  | 289                 | 21A           | +                   |
| 252                 | 100C          | ++                  | 290                 | 22A           | +                   |
| 253                 | 110C          | ++                  | 291                 | 23A           | +                   |
| 254                 | 122C          | ++                  | 292                 | 24A           | +                   |
| 255                 | 123C          | ++                  | 293                 | 26A           | +                   |
| 256                 | 137C          | ++                  | 294                 | 30A           | +                   |
| 257                 | 4D            | ++                  | 295                 | 31A           | +                   |
| 258                 | 11D           | ++                  | 296                 | 33A           | +                   |
| 259                 | 16D           | ++                  | 297                 | 35A           | +                   |
| 260                 | 27D           | ++                  | 298                 | 36A           | +                   |
| 261                 | 31D           | ++                  | 299                 | 37A           | +                   |
| 262                 | 32D           | ++                  | 300                 | 38A           | +                   |
| 263                 | 62D           | ++                  | 301                 | 40A           | +                   |
| 264                 | 71D           | ++                  | 302                 | 41A           | +                   |
| 265                 | 72D           | ++                  | 303                 | 42A           | +                   |
| 266                 | 73D           | ++                  | 304                 | 43A           | +                   |

Continuación...

| <b>Cultivo puro</b> | <b>Código</b> | <b>Calificativo</b> | <b>Cultivo puro</b> | <b>Código</b> | <b>Calificativo</b> |
|---------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------|---------------------|
| 305                 | 47A           | +                   | 343                 | 4B            | +                   |
| 306                 | 48A           | +                   | 344                 | 6B            | +                   |
| 307                 | 49A           | +                   | 345                 | 9B            | +                   |
| 308                 | 50A           | +                   | 346                 | 13B           | +                   |
| 309                 | 51A           | +                   | 347                 | 18B           | +                   |
| 310                 | 52A           | +                   | 348                 | 21B           | +                   |
| 311                 | 53A           | +                   | 349                 | 33B           | +                   |
| 312                 | 54A           | +                   | 350                 | 34B           | +                   |
| 313                 | 58A           | +                   | 351                 | 35B           | +                   |
| 314                 | 59A           | +                   | 352                 | 37B           | +                   |
| 315                 | 60A           | +                   | 353                 | 39B           | +                   |
| 316                 | 61A           | +                   | 354                 | 44B           | +                   |
| 317                 | 62A           | +                   | 355                 | 45B           | +                   |
| 318                 | 65A           | +                   | 356                 | 50B           | +                   |
| 319                 | 66A           | +                   | 357                 | 51B           | +                   |
| 320                 | 67A           | +                   | 358                 | 53B           | +                   |
| 321                 | 68A           | +                   | 359                 | 54B           | +                   |
| 322                 | 69A           | +                   | 360                 | 55B           | +                   |
| 323                 | 70A           | +                   | 361                 | 61B           | +                   |
| 324                 | 71A           | +                   | 362                 | 62B           | +                   |
| 325                 | 72A           | +                   | 363                 | 64B           | +                   |
| 326                 | 76A           | +                   | 364                 | 65B           | +                   |
| 327                 | 77A           | +                   | 365                 | 75B           | +                   |
| 328                 | 78A           | +                   | 366                 | 76B           | +                   |
| 329                 | 79A           | +                   | 367                 | 83B           | +                   |
| 330                 | 82A           | +                   | 368                 | 84B           | +                   |
| 331                 | 83A           | +                   | 369                 | 6C            | +                   |
| 332                 | 84A           | +                   | 370                 | 7C            | +                   |
| 333                 | 85A           | +                   | 371                 | 8C            | +                   |
| 334                 | 87A           | +                   | 372                 | 11C           | +                   |
| 335                 | 88A           | +                   | 373                 | 12C           | +                   |
| 336                 | 89A           | +                   | 374                 | 16C           | +                   |
| 337                 | 90A           | +                   | 375                 | 17C           | +                   |
| 338                 | 92A           | +                   | 376                 | 18C           | +                   |
| 339                 | 93A           | +                   | 377                 | 19C           | +                   |
| 340                 | 94A           | +                   | 378                 | 24C           | +                   |
| 341                 | 1B            | +                   | 379                 | 25C           | +                   |
| 342                 | 3B            | +                   | 380                 | 26C           | +                   |

Continuación...

| <b>Cultivo puro</b> | <b>Código</b> | <b>Calificativo</b> | <b>Cultivo puro</b> | <b>Código</b> | <b>Calificativo</b> |
|---------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------|---------------------|
| 381                 | 27C           | +                   | 419                 | 101C          | +                   |
| 382                 | 30C           | +                   | 420                 | 102C          | +                   |
| 383                 | 31C           | +                   | 421                 | 107C          | +                   |
| 384                 | 32C           | +                   | 422                 | 108C          | +                   |
| 385                 | 34C           | +                   | 423                 | 109C          | +                   |
| 386                 | 38C           | +                   | 424                 | 111C          | +                   |
| 387                 | 40C           | +                   | 425                 | 112C          | +                   |
| 388                 | 41C           | +                   | 426                 | 113C          | +                   |
| 389                 | 43C           | +                   | 427                 | 124C          | +                   |
| 390                 | 44C           | +                   | 428                 | 125C          | +                   |
| 391                 | 47C           | +                   | 429                 | 126C          | +                   |
| 392                 | 49C           | +                   | 430                 | 127C          | +                   |
| 393                 | 51C           | +                   | 431                 | 128C          | +                   |
| 394                 | 52C           | +                   | 432                 | 129C          | +                   |
| 395                 | 54C           | +                   | 433                 | 130C          | +                   |
| 396                 | 59C           | +                   | 434                 | 131C          | +                   |
| 397                 | 60C           | +                   | 435                 | 135C          | +                   |
| 398                 | 61C           | +                   | 436                 | 136C          | +                   |
| 399                 | 63C           | +                   | 437                 | 3D            | +                   |
| 400                 | 72C           | +                   | 438                 | 5D            | +                   |
| 401                 | 73C           | +                   | 439                 | 6D            | +                   |
| 402                 | 74C           | +                   | 440                 | 7D            | +                   |
| 403                 | 75C           | +                   | 441                 | 9D            | +                   |
| 404                 | 78C           | +                   | 442                 | 10D           | +                   |
| 405                 | 81C           | +                   | 443                 | 13D           | +                   |
| 406                 | 82C           | +                   | 444                 | 14D           | +                   |
| 407                 | 86C           | +                   | 445                 | 15D           | +                   |
| 408                 | 87C           | +                   | 446                 | 17D           | +                   |
| 409                 | 88C           | +                   | 447                 | 20D           | +                   |
| 410                 | 89C           | +                   | 448                 | 21D           | +                   |
| 411                 | 90C           | +                   | 449                 | 26D           | +                   |
| 412                 | 91C           | +                   | 450                 | 30D           | +                   |
| 413                 | 92C           | +                   | 451                 | 34D           | +                   |
| 414                 | 93C           | +                   | 452                 | 39D           | +                   |
| 415                 | 96C           | +                   | 453                 | 41D           | +                   |
| 416                 | 97C           | +                   | 454                 | 75D           | +                   |
| 417                 | 98C           | +                   | 455                 | 76D           | +                   |
| 418                 | 99C           | +                   | 456                 | 78D           | +                   |

Continuación...

| <b>Cultivo puro</b> | <b>Código</b> | <b>Calificativo</b> | <b>Cultivo puro</b> | <b>Código</b> | <b>Calificativo</b> |
|---------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------|---------------------|
| <b>457</b>          | 80D           | +                   | <b>467</b>          | 117D          | +                   |
| <b>458</b>          | 91D           | +                   | <b>468</b>          | 119D          | +                   |
| <b>459</b>          | 92D           | +                   | <b>469</b>          | 123D          | +                   |
| <b>460</b>          | 97D           | +                   | <b>470</b>          | 136D          | +                   |
| <b>461</b>          | 98D           | +                   | <b>471</b>          | 137D          | +                   |
| <b>462</b>          | 99D           | +                   | <b>472</b>          | 138D          | +                   |
| <b>463</b>          | 103D          | +                   | <b>473</b>          | 139D          | +                   |
| <b>464</b>          | 108D          | +                   | <b>474</b>          | 151D          | +                   |
| <b>465</b>          | 109D          | +                   | <b>475</b>          | 152D          | +                   |
| <b>466</b>          | 110D          | +                   |                     |               |                     |