



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



**Evaluación de la Capacidad de remoción de cadmio mediante
Levaduras (*Metschnikowia pulcherrima*, *Lecythophora sp.LE034*),
aisladas del volcán Tungurahua**

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autora: Daniela Magaly Aguas Bonilla

Tutora: Lic. Nahir Yerely Dugarte Jiménez, Ph.D

Ambato - Ecuador

Julio - 2016

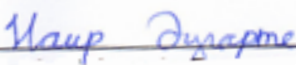
APROBACIÓN DEL TUTOR

Lic. Nahir Yerely Dugarte Jiménez, Ph.D

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 18 Mayo del 2016.



Lic. Nahir Yerely Dugarte Jiménez, Ph.D

C.I: 1753479193

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Daniela Magaly Aguas Bonilla, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Daniela Magaly Aguas Bonilla

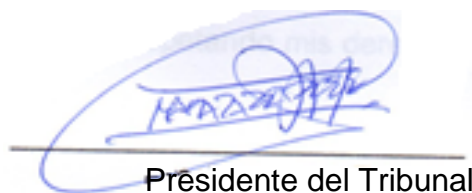
C.I: 180385871-9

AUTORA

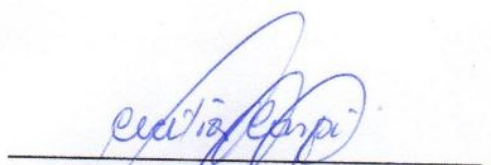
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato


Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Ing. Mg. Cecilia Mercedes Carpio
C.I. 1704627650



Lic. M.Sc. Paulo Baquero Icaza
C.I. 1803233541

Ambato, 23 de Junio del 2016.

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción nos suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Daniela Magaly Aguas Bonilla

C.I: 180385871-9

AUTORA

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis papitos queridos, por ser el motor de mi vida. Gracias por todo el apoyo brindado, por sus consejos, sus palabras de aliento y motivación a lo largo de mi carrera.

A mis hermanos y sobrinos, por siempre estar presentes y pendientes de mí. Carmen, Fabiola, Luis, Jenny, por ser mi ejemplo a seguir y a mi hermana pequeña Ruby por las desveladas juntas y constante ayuda.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato, a la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos por además de permitirme formarme profesionalmente, por ser mí segundo hogar.

A la Unidad Operativa de Investigación y desarrollo (UODIDE) y todo su equipo por permitirme desarrollar la parte experimental de esta investigación

A la Lic. Nahir Dugarte, Ph.D y al Químico Cesar Yambay por el tiempo, paciencia y por la oportunidad de desarrollar junto a ellos el trabajo de investigación, sin su ayuda no hubiera sido posible su realización, muchas gracias.

A todos los profesores por impartirme sus conocimientos, orientándome de la mejor manera.

A mis compañeros Joha, Mario, Juan José, por todos los momentos vividos en clase y por brindarme su valiosa amistad.

A Marco y Jonathan por su incondicional apoyo durante la realización de este trabajo.

Finalmente a mis padres, hermanos y sobrinos, por siempre haber creído en mí.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

Portada.....	I
Aprobación por el tutor.....	II
Declaración de autenticidad.....	III
Aprobación de los miembros del tribunal de grado.....	IV
Derechos de autor.....	V
Dedicatoria.....	VI
Agradecimientos.....	VII
Índice general de contenidos.....	VIII
Índice de tablas y figuras.....	XI
Resumen.....	XIV
<i>Abstract</i>	XV

TEXTO

CAPÍTULO I	4
EL PROBLEMA	4
1.1. Tema de la investigación.....	4
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	6
CAPÍTULO II	7
MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antecedentes investigativos.....	7
2.2. Hipótesis.....	8

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis	8
CAPÍTULO III	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Material.....	9
3.2. Métodos.....	9
3.2.1 Activación y conservación de levadura.....	9
3.2.2. Elaboración de la curva McFarland.....	10
3.2.3. Determinación del número de unidades formadoras de colonias ufc y exponente mediante la curva McFarland	10
3.2.4. Determinación del factor de crecimiento	11
3.2.5. Determinación de inhibición de crecimiento de levaduras frente a diferentes concentraciones de cadmio.....	12
3.2.6. Elaboración de la curva de análisis de cadmio por el método de la ditizona.....	13
3.2.6.1 Preparación de reactivos.....	13
3.2.6.2 Tratamiento de los estándares y muestras.....	14
3.2.6.3 Desarrollo de color, extracción y medida.	15
3.2.7. Comparación del método de ditizona y absorción atómica para análisis de cadmio	15
3.2.8. Remoción de cadmio mediante levaduras	16
3.2.8.1. Interferencias en la cuantificación de cadmio.....	16
3.2.8.2. Capacidad de remoción de cadmio	17
3.2.8.3. Capacidad de supervivencia de las levaduras en el proceso de remoción de cadmio.....	18
3.3. Diseño Experimental	18
CAPÍTULO IV	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. Análisis y discusión de los resultados	19

4.1.1. Elaboración de la curva McFarland.....	19
4.1.2. Determinación del número de unidades formadoras de colonias ufc y exponente mediante la curva McFarland	20
4.1.3. Determinación del factor de crecimiento	23
4.1.4. Determinación de inhibición de crecimiento de las levaduras frente al cadmio.....	26
4.1.5. Elaboración de curva de análisis de cadmio	28
4.1.6. Comparación entre el método de ditizona y absorción atómica para análisis de cadmio	30
4.1.7. Remoción de cadmio mediante levaduras	31
4.1.7.1. Interferencias detectadas	32
4.1.7.2. Pruebas preliminares	34
4.1.7.3. Remoción de cadmio.....	35
4.1.7.4. Análisis de varianza de los porcentajes de remoción de cadmio de las tres levaduras.....	37
4.1.7.5. Capacidad de remoción a concentración baja	39
4.1.7.6. Capacidad de supervivencia de levaduras en el proceso de remoción... ..	40
4.2. Verificación de hipótesis.....	42
CAPÍTULO V	43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
5.1. Conclusiones	43
5.2. Recomendaciones.....	44
MATERIALES DE REFERENCIA.....	44
Referencias bibliográficas	44
Anexos... ..	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volumen de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y cloruro de bario ($BaCl_2$), para la curva McFarland	10
Tabla 2. Concentración de cloruro de cadmio ($CdCl_2$) utilizadas en la determinación de inhibición de crecimiento	13
Tabla 3. Preparación de los estándares para la curva de cadmio.....	14
Tabla 4. Absorbancias (Abs) de la curva McFarland.....	19
Tabla 5. Número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml).....	21
Tabla 6. Recuento en placa para la levadura <i>M. pulcherrima</i>	22
Tabla 7. Recuento en placa para la levadura <i>L. sp.LE034</i>	22
Tabla 8. Recuento en placa para la levadura <i>S. cerevisiae</i>	22
Tabla 9. Tabla resumen del número de exponente para cada levadura.....	23
Tabla 10. Número de unidades formadoras de colonias iniciales (ufc/ml) para el factor de crecimiento.....	23
Tabla 11. Número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml) de la dilución (10^7) después de 72 horas de la levadura <i>M. pulcherrima</i>	24
Tabla 12. Número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml) de la dilución (10^7) después de 72 horas de la levadura <i>L. sp.LE034</i>	24
Tabla 13. Número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml) de la dilución (10^7) después de 72 horas de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	24
Tabla 14. Recuento en placa de levadura <i>M. pulcherrima</i> después de las 72 horas (10^7)	25
Tabla 15. Recuento en placa de levadura <i>L. sp.LE034</i> después de las 72 horas (10^7)	25
Tabla 16. Recuento en placa de levadura <i>S. cerevisiae</i> después de las 72 horas (10^7)	25
Tabla 17. Factores de crecimiento real y proyectado para cada levadura	25
Tabla 18. Inhibición de crecimiento de <i>M. pulcherrima</i> frente al cadmio (600nm)	27

Tabla 19. Inhibición de crecimiento de <i>L.sp.LE034</i> frente al cadmio (600nm) .	27
Tabla 20. Inhibición de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> frente al cadmio (600nm)	28
Tabla 21. Absorbancias (Abs) de la curva de análisis de cadmio por el método de la ditizona	29
Tabla 22. Estándares de 214 µg/l antes y después de la digestión por el método de la ditizona y por absorción atómica	30
Tabla 23. Soluciones de 107 µg/l antes y después de la digestión por el método de la ditizona y por absorción atómica	30
Tabla 24. Muestras con biomasa de levaduras antes y después de la digestión por el método de la ditizona y por absorción atómica	31
Tabla 25. Interferencia del caldo YM	32
Tabla 26. Interferencia de la centrifuga en caldo YM.....	32
Tabla 27. Interferencia de la centrifuga en agua destilada.	33
Tabla 28. Interferencia de la biomasa	33
Tabla 29. Interferencia de la filtración en caldo YM	34
Tabla 30. Interferencia de la filtración en agua destilada.....	34
Tabla 31. Pruebas preliminares de remoción de cadmio	34
Tabla 32. Controles de calidad (estándares de 214 µg/l) en la remoción de cadmio por réplica de levadura.	35
Tabla 33. Cuadro resumen del porcentaje de remoción de cadmio.....	36
Tabla 34. Remoción de cadmio a concentraciones bajas	39
Tabla 35. Porcentaje de remoción de cadmio a concentraciones bajas	39
Tabla 36. Número de unidades formadoras de colonias iniciales de la tercera réplica para supervivencia (ufc/ml).....	40
Tabla 37. Supervivencia frente al cadmio para la levadura <i>L. sp.LE034</i>	40
Tabla 38. Supervivencia frente al cadmio para la levadura <i>M. pulcherrima</i>	40
Tabla 39. Supervivencia frente al cadmio para la levadura <i>S. cerevisiae</i>	41

Tabla 40. Número de unidades formadoras de colonias (ufc) necesarias para biosorber 1 μg de cadmio.....	41
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Determinación del exponente de las levaduras mediante diluciones	11
Figura 2. Determinación del factor de crecimiento de las levaduras mediante diluciones	12

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Ecuación de la curva McFarland	20
Gráfico 2. Curva de análisis de cadmio por el método de la ditizona.....	29
Gráfico 3. Remoción de cadmio mediante <i>S. cerevisiae</i>	36
Gráfico 4. Remoción de cadmio mediante <i>M. pulcherrima</i>	37
Gráfico 5. Remoción de cadmio mediante <i>L. sp.LE034</i>	37

RESUMEN

En este estudio se determinó la capacidad de remoción de cadmio mediante la utilización de biomasa de levaduras aisladas del volcán Tungurahua. Se escogieron dos especies *Metschnikowia pulcherrima*, *Lecythophora sp.LE034* y una tercera especie comercial como referencia *Saccharomyces cerevisiae*. La determinación del cadmio en el proceso de remoción fue analizada mediante una modificación al método colorimétrico de la ditizona según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0982. Las unidades formadoras de colonias (ufc) y el factor de crecimiento fueron determinadas en diluciones seriadas mediante la curva McFarland y recuento de difusión en placa de agar. El porcentaje de inhibición de crecimiento frente al cadmio utilizando concentraciones desde 107 hasta 1,07 µg/l, fue de entre 85% y 95%, siendo la levadura *Lecythophora sp.LE034* la más susceptible a la inhibición.

En el proceso de remoción se determinó que las tres levaduras son capaces de remover eficientemente entre el 88% - 89% de cadmio.

Palabras claves: Remoción de cadmio, levaduras aisladas, volcán Tungurahua, ditizona, biosorción.

ABSTRACT

This study determined the removal capacity of cadmium through the use of biomass of yeasts isolated from the Tungurahua volcano. It was chosen two species *Metschnikowia pulcherrima*, *Lecythophora sp. LE034* and a third commercial species as reference *Saccharomyces cerevisiae*. The determination of cadmium in the removal process was tested by the modification of the colorimetric method of the dithizone by Ecuadorian technical standard INEN 0982. The number of colony forming units (cfu) and growth factor of a series of dilutions were determined through McFarland curve and count per diffusion in plate. The percentage of inhibition of growth against cadmium using concentrations from 107 up to 1,07 µg/l, was between 85% and 95%, being the yeast *Lecythophora sp. LE034* the most susceptible to inhibition.

The removal process showed that the three yeasts are able to efficiently remove between 88-89% of cadmium.

Keywords: Removal of cadmium, isolated yeasts, Tungurahua volcano, dithizone, biosorption.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua, aire y suelo por metales pesados es uno de los problemas ambientales más severos, además de ser muy difícil de resolver. El cadmio es una sustancia que se encuentra en forma natural en la corteza terrestre, puede convertirse en contaminante si su distribución en el ambiente es alterado debido a actividades humanas. En Ecuador las principales fuentes de contaminación son: baterías, pilas, pigmentos y estabilizadores en plástico y PVC, pigmentos en pinturas, galvanización, catalizadores y conservadores en la industria del plástico, aleaciones **(Ministerio del Ambiente Ecuador, s. f)**.

La eliminación de este metal del medio ambiente es prioritaria debido a su elevada toxicidad, ya que es carcinogénico, embriotóxico, teratogénico y mutagénico, puede causar hiperglicemia, reducir el sistema inmunológico y anemia, debido a que interfiere con el metabolismo del hierro **(Acosta et al., 2007)**.

Métodos tales como la precipitación, floculación, intercambio iónico y filtración han sido utilizados convencionalmente para la eliminación de metales pesados a partir de agua. Pero durante las últimas décadas, la eliminación de metales tóxicos utilizando algas inactivadas, hongos y biomasa bacteriana se ha estudiado ampliamente y se ha introducido como un método barato y novedoso en relación a los métodos convencionales **(Halttunen, 2008)**.

Actualmente existen tres categorías generales de procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos que contienen metales tóxicos: la biosorción, la precipitación extracelular y la captación a través de biopolímeros purificados y de otras moléculas especializadas, derivadas de células microbianas **(Sandoval, 2006)**.

La 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 la captación **(Cañizares-Villanueva, 2000)**.

Sandoval (2006) menciona que el proceso involucra una fase sólida (biosorbente, como las membranas o paredes celulares) y una fase líquida (solvente, generalmente es agua) en la cual están la(s) especie(s) metálica(s) a ser biosorbida(s). Debido a la gran afinidad del biosorbente por la especie metálica, este último es atraído hacia el sólido siendo atrapado por diversos mecanismos, como las interacciones con los diferentes grupos funcionales que se encuentran en las superficies celulares de los microorganismos. Los potenciales sitios de unión en las superficies celulares son los hidroxilos, sulfhidrilos, aminas, amidas, grupos imidazol, carboxilos, fosfatos, y tioésteres, entre otros. El proceso de biosorción es continuo, hasta que se establece un equilibrio entre la especie metálica disuelta y la que ha sido biosorbida por la biomasa.

La biomasa a base de levaduras se ha usado con éxito como bioadsorbente para la eliminación de plata, oro, cadmio, cobalto, cobre, cromo, níquel, plomo, uranio, talio y zinc en disolución acuosa. Especialmente el uso de biomasa muerta tiene ventajas sobre la utilización de biomasa viva debido a que no es necesario adicionar nutrientes, la operación es inmune a la toxicidad o a condiciones de operación adversas para la vida, los procesos no están gobernados por limitaciones biológicas, la recuperación de los metales retenidos es más fácil y la biomasa se comporta como un intercambiador de iones **(Macaskie, 1990)**.

Además, las levaduras exhiben la capacidad para adaptarse a condiciones extremas tales como la temperatura, el pH y varios niveles de contaminantes orgánicos e inorgánicos que las hacen un material potencial para ser utilizados en la remediación de ambientes contaminados **(Trama et al., 2014)**.

La eficiencia de biosorción de metales pesados depende de muchos factores ambientales, incluyendo pH, temperatura, tiempo de contacto, concentración de biomasa, la edad de la biomasa, concentración del metal y presencia de otros iones en una solución **(Zabochnicka-Świątek & Krzywonos, 2014)**. Las concentraciones de biomasa se pueden determinar de varias maneras, mediante el recuento en placa y la medición de dispersión de la luz por las células bacterianas en un medio líquido.

El método McFarland se utiliza para normalizar el número aproximado de bacterias en una suspensión líquida mediante la comparación de la turbidez entre la suspensión prueba con la del estándar McFarland. Cuando se agita bien, la turbidez de McFarland es visualmente comparable a una suspensión bacteriana de concentración conocida **(Martin & Palomino, 2012)**. El método McFarland fue diseñado originalmente para la estimación del número aproximado de células bacterianas pero se utiliza para comparar y/o estandarizar suspensiones de otros microorganismos **(Joya & Milagros, 2008)**.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema de la investigación

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE CADMIO MEDIANTE LEVADURAS (*Metschnikowia pulcherrima*, *Lecythophora sp.LE034*), AISLADAS DEL VOLCÁN TUNGURAHUA.

1.2. Justificación

La contaminación por metales pesados es una importante preocupación mundial debido a la toxicidad, amenaza a la vida humana y medio ambiente. Muchas investigaciones se han llevado a cabo sobre la contaminación por metales en el suelo de diversas fuentes antropogénicas como desechos industriales, emisiones automovilísticas, actividad minera y prácticas agrícolas (**Rajendran, Muthukrishnan & Gunasekaran, 2003**). Su lanzamiento indiscriminado es una de las principales preocupaciones de salud en todo el mundo, ya que no se pueden descomponer a las formas no tóxicas y por lo tanto tienen efectos de larga duración sobre el ecosistema. Muchos de ellos son tóxicos incluso en concentraciones muy bajas; arsénico, cadmio, cromo, cobre, plomo, mercurio, níquel, selenio, plata, zinc, etc (**Dixit et al., 2015**).

El cadmio es un metal altamente tóxico y cancerígeno utilizado en placas de metal, baterías de níquel-cadmio, pigmentos, estabilizadores plásticos, pesticidas y más. Es más tóxico en su forma libre (iónico), que se disuelve fácilmente y se mueve a través del agua, poniendo en peligro principalmente al suelo y suministros de agua subterránea (**Brookhaven National Laboratory, 2000**).

La biorremediación es una tecnología innovadora y prometedora disponible para la eliminación y la recuperación de los metales pesados en el agua

contaminada y las tierras. Dado que los microorganismos han desarrollado diversas estrategias para su supervivencia en los hábitats contaminados por metales pesados, estos organismos son conocidos por desarrollar y adoptar diferentes mecanismos de desintoxicación como biosorción, bioacumulación, biotransformación y biomineralización, que puede ser explotada para la biorremediación ya sea ex situ o in situ (**Dixit et al., 2015**).

Varios estudios han demostrado la eficiencia de las levaduras en biorremediación. La acumulación de iones por biomasa se lleva a cabo principalmente por biosorción independiente del metabolismo, donde la pared celular es el principal sitio de acumulación de metales (**Moreno, Becerra & Santos, 2004**).

El presente trabajo tiene como finalidad evaluar la capacidad de remoción de cadmio mediante levaduras aisladas en la investigación presentada por **Hidalgo (2015)** sobre el primer estudio de la diversidad de levaduras asociadas a un volcán: Tungurahua, Ecuador. En el estudio se aislaron 10 especies de levaduras y se identificaron cinco órdenes diferentes, de las cuales se evaluarán dos especies: *Metschnikowia pulcherrima*, *Lecythophora sp.LE034* como potenciales biorremediadores, dándole de esta manera un valor agregado a la biodiversidad de especies extremófilas propias del Ecuador.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de remoción de cadmio mediante levaduras (*M. pulcherrima*, *L. sp.LE034*), aisladas del volcán Tungurahua.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Elaborar la curva McFarland para determinar la cantidad de ufc/ml de las levaduras.
2. Elaborar una curva para determinar la concentración de cadmio por el método de la ditizona.
3. Determinar la remoción máxima de cadmio por las levaduras (*M. pulcherrima*, *L. sp.LE034*)

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

Debido a los efectos devastadores de contaminación por metales pesados, investigadores continúan en la búsqueda de materiales rentables para la reducción de los metales tóxicos. La biosorción y el uso de materiales biológicos, ha tomado un enfoque importante en la remoción de metales pesados. Estudios previos han reportado el uso eficaz de biomasa no viva de diferentes organismos para biosorción, mencionando la biomasa de levadura como un biosorbente eficaz de Cadmio (**Casamorin, Bennett & Dedeles, 2014**).

La biomasa de levaduras es conocida por tolerar metales pesados. Se trata de un grupo versátil, ya que puede adaptarse y crecer bajo condiciones extremas de pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes, así como altas concentraciones de metal (**Anand et al., 2006**). Ofrecen la ventaja de tener material de la pared celular que muestra excelentes propiedades de unión de metal (**Gupta et al., 2000**). Estudios recientes mostraron que las cepas aisladas de sitios contaminados tienen una excelente capacidad de eliminar cantidades significativas de metales de soluciones acuosas (**Malik, 2004**).

El uso de levaduras en el tratamiento de ambientes contaminados con metales pesados, resulta en la biosorción de los agentes tóxicos por la biomasa celular y/o el transporte dentro de la célula (**Kaszycki et al., 2004**). Esta capacidad se ha estudiado en *Saccharomyces cerevisiae*, que acumula cromo, cadmio y otros metales (**Ksheminska et al., 2003**).

En estudios recientes, se han descrito cepas fúngicas capaces de realizar procesos de biorremediación en la transformación de Cr (VI) a especies reducidas. Dichas cepas comprenden levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Lecythophora sp.* que han sido implementadas en procesos

biotecnológicos de tratamiento de efluentes industriales (**Corona et al., 2010**). Para la especie *Metschnikowia pulcherrima* dentro de la búsqueda bibliográfica realizada no se encontraron estudios sobre su utilización en procesos de biosorción.

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis Nula

¿Existe remoción de cadmio mediante el uso de levaduras (*M. pulcherrima*, *L. sp.LE034*)?

2.2.2. Hipótesis Alternativa

¿No existe remoción de cadmio mediante el uso de levaduras (*M. pulcherrima*, *L. sp.LE034*)?

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1. Variable Independiente

- Especies de Levadura: (*M. pulcherrima*, *L. sp.LE034*) aisladas del volcán Tungurahua.
- Concentraciones de cadmio ($\mu\text{g/l}$)

2.3.2. Variable Dependiente

- Capacidad de remoción de cadmio (%)
- Tiempos de Contacto (horas)

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material

PDA (agar papa dextrosa), (Neogen[®] Corporation, USA); D-glucosa anhidra granular (Mallinckrodt Chemicals, USA); Bacto[™] extracto de levadura (Becton Dickinson and Company, USA); Bacto[™] extracto de malta (Becton Dickinson and Company, USA); Bacto[™] peptona (Becton Dickinson and Company, USA).

3.1.2 Material y Equipos

Balones de aforo de 25 ml (Pyrex ± 0.04 ml), balones de aforo de 200 ml (Pyrex ± 0.10 ml), bureta de 25 ml (Glassco ± 0.05 ml), micropipetas (Corning[®], USA), vortex mixer (Labnet, Inc., USA), balanza analítica modelo PA214 (Ohaus, Suiza), contador de colonias (Boeco Germany, Alemania), autoclave modelo 25X-1 (Distenics Corporation, Ecuador), autoclave Hiclave[™] modelo Hv- 85 (Amerex Instruments, Inc., USA), incubadora Incucell (MMM group, Alemania), cabina de seguridad biológica - class II, type A2 (Labconco, USA), incubadora con agitación (Ivymen system)

3.2. Métodos

3.2.1. Activación y conservación de levaduras

Las levaduras aisladas previamente *M. pulcherrima*, *L. sp.LE034* y *S. cerevisiae*, fueron reactivadas mediante la siembra por estrías compuestas en medio PDA e incubadas a 27°C por 72 horas.

Posteriormente se realizó el raspado de la biomasa para cada levadura. Se colocó en tubos que contenían 10 ml de glicerol al 20% (p/v) y se homogenizó con la ayuda del vortex. Posteriormente se almacenaron en crioviales etiquetados de 1 ml, respectivamente, y se congelaron a -10°C, para asegurar la viabilidad de las cepas a lo largo de la investigación.

3.2.2. Elaboración de la curva McFarland.

Para obtener la ecuación de la curva McFarland, se mezclaron cantidades apropiadas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y cloruro de bario ($BaCl_2$), para obtener cantidades conocidas de sulfato de bario ($BaSO_4$). En la realización de la curva se utilizó la siguiente tabla de escala McFarland (Tabla 1).

Tabla 1. Volumen de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y cloruro de bario ($BaCl_2$), para la curva McFarland.

Escala de McFarland	$BaCl_2$ (0,048 M)	H_2SO_4 (0,18 M)	Volumen final (ml)	$BaSO_4$, (M)	Concentración celular
1	0,1	9,9	10,0	0,00048	3×10^x
2	0,2	9,8	10,0	0,00096	6×10^x
3	0,3	9,7	10,0	0,00144	9×10^x
4	0,4	9,6	10,0	0,00192	12×10^x
5	0,5	9,5	10,0	0,00240	15×10^x
6	0,6	9,4	10,0	0,00288	18×10^x
7	0,7	9,3	10,0	0,00336	21×10^x
8	0,8	9,2	10,0	0,00384	24×10^x
9	0,9	9,1	10,0	0,00432	27×10^x
10	1,0	9,0	10,0	0,00480	30×10^x

La curva se realizó por triplicado y se determinó la estimación lineal.

3.2.3. Determinación del número de unidades formadoras de colonias (ufc) y exponente mediante la curva McFarland

La biomasa se obtuvo mediante la realización de estrías compuestas para lo cual se inocularon 30 μ l de los crioviales de las levaduras anteriormente conservadas, en cajas petri con medio PDA y se incubaron a 27°C por 72 horas, después de este lapso de tiempo se raspó la biomasa (Anexo A) y se colocó en un tubo de ensayo estéril que contenía 10 ml de caldo YM líquido y se homogenizó con la ayuda del vortex. Se midió la absorbancia del blanco (caldo YM) a 600 nm frente a agua destilada y la absorbancia del tubo (caldo YM + levadura) a 600 nm frente al blanco. El número de ufc/ml se determinó utilizando la ecuación de la curva McFarland.

Para determinar el exponente de las levaduras se realizaron diluciones seriadas en agua estéril y se inoculó 1ml del caldo YM + levadura hasta alcanzar la dilución 10^8 . Posteriormente se sembró por triplicado 1 ml de las

diluciones 10^6 , 10^7 y 10^8 sobre PDA para recuento en placa. Finalmente las cajas se incubaron a 27°C por 72 horas y se realizó el recuento de las colonias obtenidas en cada una de las diluciones (Fig 1).

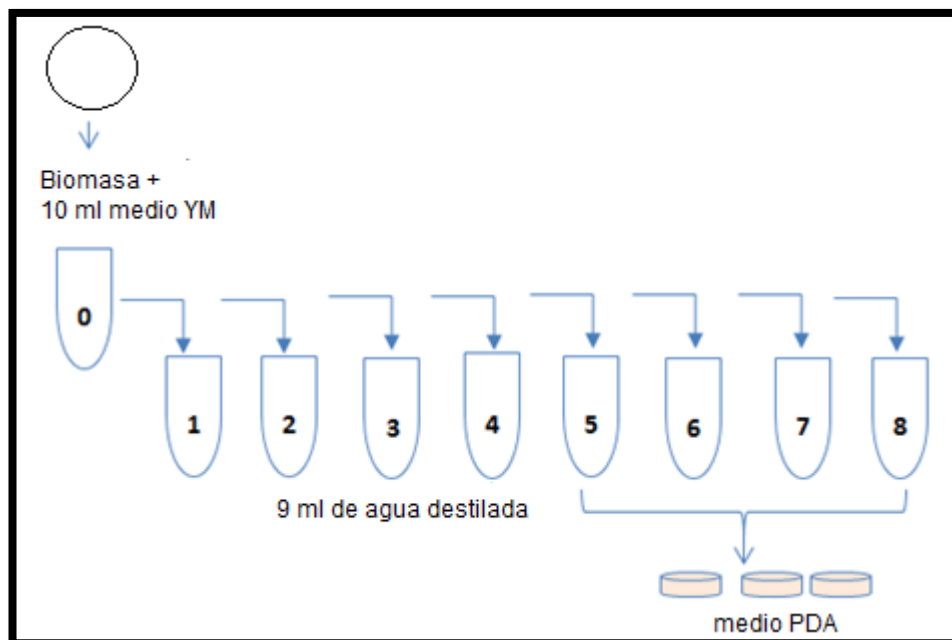


Figura 1. Determinación del exponente de las levaduras mediante diluciones

3.2.4. Determinación del factor de crecimiento

Para determinar el factor de crecimiento se partió utilizando biomasa recién obtenida y determinando las ufc/ml, de igual manera que en el numeral 3.2.3. Posteriormente con esta suspensión de biomasa se realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar la dilución 10^7 , se inocularon 9 ml de caldo YM y 1 ml de esta última dilución. Los tubos fueron incubados a 27°C por 72 horas, transcurrido el tiempo se midió la absorbancia de los tubos a 600 nm frente al blanco (caldo YM), y se aplicó la ecuación de la curva McFarland.

Se realizaron nuevamente diluciones seriadas y se sembró la dilución respectiva de acuerdo al número de exponente para su comprobación por recuento en placa (Fig 2).

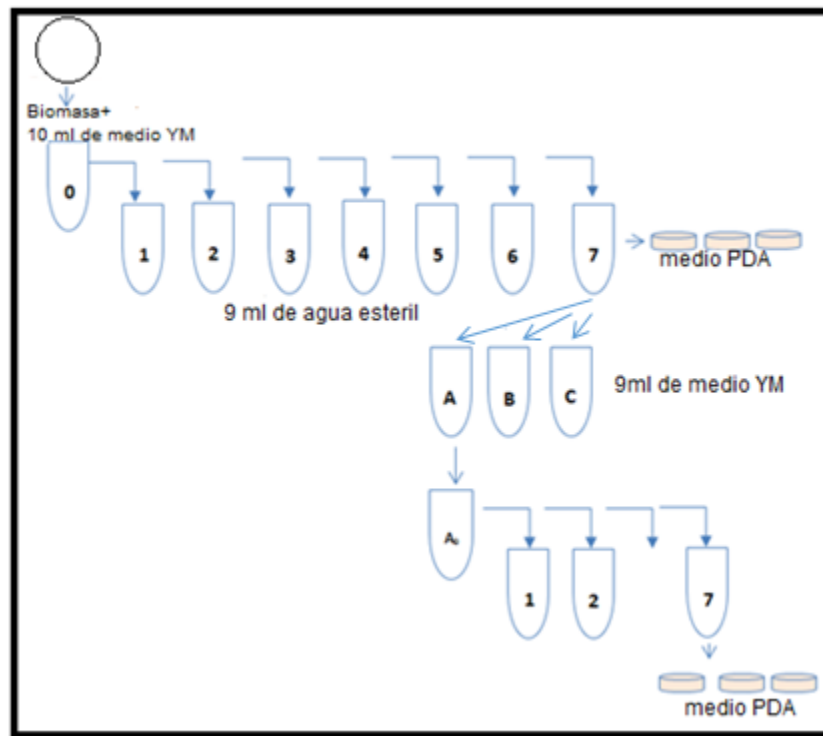


Figura 2. Determinación del factor de crecimiento de las levaduras mediante diluciones

3.2.5. Determinación de inhibición de crecimiento de levaduras frente a diferentes concentraciones de cadmio

Para determinar la inhibición de crecimiento, la biomasa utilizada fue recién obtenida y se calculó las ufc/ml al igual que en el numeral 3.2.3. Se preparó una solución madre de cloruro de cadmio (CdCl_2) de 2140 $\mu\text{g/ml}$, pesando 0,0872 g y aforando a 25 ml de caldo YM. De esta solución madre se realizaron soluciones en caldo YM tomando como referencia las concentraciones mencionadas en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0982. Se amplió a 9 soluciones de 107; 85,6; 64,2; 42,8; 21,4; 10,7; 6,42; 2,14; 1,07 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de cloruro de cadmio (CdCl₂) utilizada en la determinación de inhibición de crecimiento

Alícuota (ml)	Caldo YM (ml)	Volumen total (ml)	Cd (µg/ml)	Cd (µmol)
0,500	9,500	10,000	107,000	95,200
0,400	9,600		85,600	76,200
0,300	9,700		64,200	57,100
0,200	9,800		42,800	38,100
0,100	9,900		21,400	19,000
0,050	9,950		10,700	9,500
0,030	9,970		6,4200	5,700
0,010	9,990		2,1400	1,900
0,005	9,995		1,0700	1,000

Posteriormente para cada levadura se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 10⁶. Se tomó 1 ml de las soluciones de cadmio de distinta concentración y se colocó en tubos estériles que contenían 8 ml de caldo YM y 1 ml de la dilución 10⁶ de la levadura. Se realizaron lecturas iniciales a 600 nm de estos tubos y de dos controles, (levadura + caldo YM) y (caldo YM + sol. concentración de cadmio). Los tubos se inocularon a 27 °C por 72 horas y transcurrido este tiempo se midieron las absorbancias finales para determinar si hubo crecimiento.

3.2.6. Elaboración de la curva de análisis de cadmio por el método de la ditizona.

Se desarrolló la modificación del método de análisis colorimétrico establecido en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0982 para la determinación de cadmio por el método de la ditizona (Anexo B).

3.2.6.1. Preparación de Reactivos

Ácido clorhídrico: (HCl) Concentrado.

Solución azul de timol: Se disolvieron 0,4 g de timol sulfonaphtalina de sodio y se aforó a 100 ml con agua destilada.

Solución NaOH (6N): Se disolvieron 24 g de hidróxido de sodio (NaOH) y se aforó a 100 ml con agua destilada.

Solución tartrato de sodio y potasio: Se pesaron 25 g de tartrato de sodio y potasio y se aforaron a 100 ml con agua destilada.

Solución I (NaOH-KCN): Se colocaron 40 g de hidróxido de sodio (NaOH) + 1 g de cianuro de potasio (KCN) y se aforaron a 100 ml con agua destilada.

Solución II (NaOH-KCN): Se colocaron 40 g de hidróxido de sodio (NaOH) + 0,05 g de cianuro de potasio (KCN) y se aforaron a 100 ml con agua destilada.

Solución clorhidrato de hidroxilamina: Se pesaron 20 g de clorhidrato de hidroxilamina (NH₂OH) y se aforó a 100 ml con agua destilada.

Solución ditizona: Se disolvieron 0,01 g de ditizona en 100 ml de cloroformo.

Solución ácido tartárico (fría): Se pesaron 2 g de ácido tartárico y se disolvieron en 100 ml con agua destilada. Debe usarse fría.

3.2.6.2. Tratamiento de los estándares y muestras

Se preparó una solución madre de Cd de 53053 µg/l a partir de cloruro de Cd (CdCl₂), pesando 0,0872 g de esta sal y se aforó a 1000 ml con agua destilada. De esta solución se prepararon 4 estándares de CdCl₂ (107, 214, 321, 428) µg/l (Tabla 3).

Tabla 3. Preparación de los estándares para la curva de cadmio

Estándares (µg/l)	Preparación
107	50µl Sol. madre/ 25ml agua destilada
214	100µl Sol. madre/ 25ml agua destilada
321	150µl Sol. madre/ 25ml agua destilada
428	200µl Sol. madre/ 25ml agua destilada

De cada uno de los estándares y muestras se colocaron 2 ml en un tubo de ensayo, se agregaron 5 µl de HCl y 20 µl de azul de timol. Se adicionaron 8-10 µl de NaOH 6N hasta que el indicador cambió a amarillo (pH aproximado de 2,8). Se colocaron 500 µl de agua destilada y se homogenizó en el vortex.

3.2.6.3. Desarrollo de color, extracción y medida

A los tubos de ensayo anteriores, se colocaron los reactivos en el siguiente orden y se los homogenizó después de cada adición. Se añadieron 100 µl de

solución de tartrato de sodio y potasio, 0,5 ml de la solución I de NaOH-KCN, 100 µl de solución de clorhidrato de hidroxilamina y 1,5 ml de solución madre de ditizona. Se tapó el embudo y se agitó por 1 minuto, se relevó la presión de vapor en los embudos a través de los tapones y no por la válvula. Se eluyó la capa de cloroformo (CHCl_3) en un segundo embudo que contenía 2,5 ml de solución de ácido tartárico frío.

Se añadió 1ml de CHCl_3 al primer embudo agitándolo por 1 min y se eluyó nuevamente la capa orgánica en el segundo embudo, evitando que la capa acuosa entrara en el segundo embudo. Se realizaron las 2 extracciones en 1 min para evitar que el contacto entre el cloroformo y la solución alcalina fuera muy prolongado y dañara el complejo ditizona-cadmio.

Posteriormente se procedió a agitar el segundo embudo por 2 minutos y se descartó la capa de cloroformo, luego se añadió 0,5 ml de CHCl_3 al embudo, se agitó por 1 min y se descartó la capa de CHCl_3 .

Al residuo en el embudo se agregaron 25 µl de clorhidrato de hidroxilamina, 1,5 ml de solución patrón de ditizona y 0,5 ml de la solución II de NaOH-KCN e inmediatamente se agitó por 1 minuto. Se insertó un tapón de algodón en el vástago del embudo y se filtró la capa orgánica en un tubo seco (Anexo C). Finalmente de este tubo se leyó la absorbancia a 518 nm frente al blanco (agua destilada) (Anexo D).

3.2.7. Comparación del método de ditizona y absorción atómica para análisis de cadmio

El análisis de comparación se realizó mediante la prueba estadística t para medias de dos muestras emparejadas, identificando si existe diferencia significativa entre los pares de datos antes y después de la digestión y entre el método de la ditizona y el de absorción atómica.

Se analizaron por el método de la ditizona entre cuatro y cinco réplicas de los estándares de concentración igual a 214 µg/l, las soluciones de 107 µg/l y las muestras con la biomasa de las levaduras estudiadas.

Los estándares de 214 µg/l se prepararon como se indica en la (Tabla 3). Para la solución de 107 µg/l se tomaron 0,5 ml de una solución de 2140 µg/l y se completó a 10 ml con agua destilada.

Para las muestras se añadieron 4 ml de la solución de 107 µg/l, 32 ml de agua destilada y 2 ml del inóculo de levadura cuya absorbancia se leyó previamente y se conocía la cantidad de ufc/ml colocada.

Se realizó la digestión de todas las muestras agregando por cada 25 ml de muestra, 2.5 ml de ácido nítrico concentrado. La evaporación se realizó en la cabina de seguridad hasta obtener $\frac{1}{4}$ del volumen, finalmente se aforó a 25 ml con agua destilada y se almacenó en frascos plásticos.

Las muestras digeridas fueron enviadas para su análisis por el método de absorción atómica al laboratorio de referencia Corplab (Quito- Ecuador).

3.2.8. Remoción de cadmio mediante levaduras

3.2.8.1. Interferencias en la cuantificación de cadmio

Se evaluaron los posibles interferentes en el proceso de remoción de cadmio; caldo YM, centrifuga, biomasa y filtración.

Para la interferencia del caldo YM, se preparó el estándar de 107 µg/l de Cd utilizando dos disolventes, agua destilada y caldo YM. Se leyeron las absorbancias a 518 nm y se determinó la concentración del metal.

Para determinar la interferencia de la centrifuga, se preparó el estándar de 107 µg/l Cd disuelto en agua destilada y en caldo YM. Se centrifugó a 4000 y a 2500 rpm por 10 min, se leyeron las absorbancias a 518 nm y se determinó la concentración del metal.

La interferencia de la biomasa de la levadura se determinó leyendo las absorbancias a 518 nm utilizando dos estándares de 107 µg/l Cd, uno disuelto únicamente en caldo YM y otro adicionándole biomasa de las levaduras estudiadas.

Finalmente se evaluó la interferencia de la filtración, se utilizaron los estándares de 107 µg/l Cd disueltos en caldo YM y en agua destilada y se los filtró con papel cualitativo. Se midieron las absorbancias a 518 nm y se determinó la concentración de Cd.

3.2.8.2. Capacidad de remoción de cadmio

Para asegurar que las lecturas por el método de la ditizona fueran confiables se utilizó como control de calidad estándares de 214 µg/l en cada una de las réplicas.

En el proceso de remoción se preparó una solución de concentración de 34240 µg/l, tomando 1,6 ml de una solución de 2140 µg/l y se completó a un volumen de 10 ml con agua destilada.

Se prepararon 3 frascos; en el primer frasco se colocaron 4ml de la solución de 34240 µg/l, 32 ml de agua destilada y 2 ml del inóculo de levadura cuya absorbancia se leyó previamente y se conocía la cantidad de ufc/ml colocada. El segundo frasco contenía 36 ml de agua destilada y 4 ml de la solución de 34240 µg/l y el tercer frasco contenía 36 ml de agua destilada y 4 ml del inóculo de levadura (Anexo E). Los tres recipientes se colocaron en un incubador con agitación a 130 rpm y a una temperatura de 27°C (Anexo F). Para las tres levaduras se tomaron alícuotas a las 0,16; 3; 6; 9 y 24 horas. Estas alícuotas fueron centrifugadas a una velocidad de 4000 rpm por 10 min, luego se tomaron 0,5 ml y se aforaron en 25 ml de agua destilada.

Finalmente se tomaron 2 ml de la muestra para proceder con la cuantificación de cadmio por el método de la ditizona.

3.2.8.3. Capacidad de supervivencia de las levaduras en el proceso de remoción de cadmio

De los tres frascos mencionados en el numeral 3.2.8.2, se tomaron alícuotas a las 0,16; 3; 6; 9 y 24 horas.

Se realizaron difusiones por triplicado para recuento en placa, inoculando 1 ml de la dilución 10^5 a las 0,16 horas, y de las diluciones 10^4 , 10^5 para la última hora de remoción evaluada, finalmente se incubaron a 27°C por 72 horas.

3.3. Diseño Experimental

La remoción de cadmio (Cd) se realizó por triplicado con dos levaduras: *M. pulcherrima*, *L. sp.LE034* aisladas del volcán Tungurahua y una levadura adicional referencial *S. cerevisiae*. Se aplicó un diseño completo al azar, el cual se analizó estadísticamente a través de un análisis de varianza y pruebas estadísticas de Tukey.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de los resultados

4.1.1. Elaboración de la curva McFarland.

De acuerdo a la metodología descrita en el numeral 3.2.2, se midió la absorbancia a 600nm (Tabla 4). Se determinó la estimación lineal (Anexo G) y la ecuación de la curva McFarland (Gráfico 1).

Tabla 4. Absorbancias (Abs) de la curva McFarland

Número de Réplica	Estándar	ufc/ml (10 ⁷)	Abs (600 nm)
Réplica 1	0	0	0,054
	1	3	0,349
	2	6	0,610
	3	9	0,866
	4	12	1,094
	5	15	1,349
	6	18	1,498
	7	21	1,681
Réplica 2	0	0	0,111
	1	3	0,369
	2	6	0,577
	3	9	0,800
	4	12	1,141
	5	15	1,325
	6	18	1,490
	7	21	1,730
Réplica 3	0	0	0,086
	1	3	0,332
	2	6	0,610
	3	9	0,892
	4	12	1,117
	5	15	1,380
	6	18	1,585
	7	21	1,736

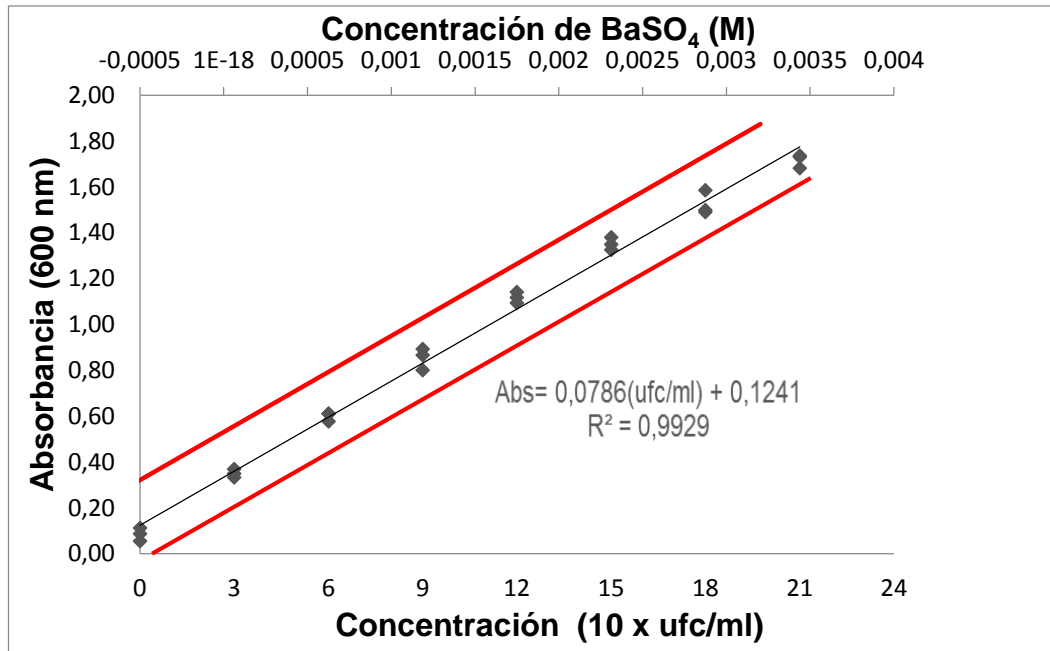


Gráfico 1. Ecuación de la Curva McFarland

4.1.2. Determinación del número de unidades formadoras de colonias (ufc) y exponente mediante la curva McFarland

Con la ecuación expresada en el Gráfico 1 se obtuvieron las unidades formadoras de colonia por mililitro ($ufc \times 10^7/ml$), el exponente determinado para cada una de las tres levaduras se resume en la (Tabla 9).

Cálculo demostrativo:

Para la R1 de *M. pulcherrima* (Tabla 5).

Absorbancia Corregida

$$Abs (corregida) = [Abs (Med + Lev) - Abs (Medio)]$$

$$Abs (corregida) = [2,506 - 0,017]$$

$$Abs (corregida) = 2,489$$

Unidades formadoras de colonia/mililitro

$$\frac{ufc}{ml} = \frac{Abs (corregida) - 0,1241}{0,0786} \quad Ec. 1$$

$$ufc/ml = \frac{2,489 - 0,1241}{0,0786} = 30,088$$

Tabla 5. Número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml)

	<i>M. pulcherrima</i>			<i>L. sp.LE034</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Abs (Medio)	0,017	0,014	0,030	0,027	0,018	0,033	0,044	0,015	0,037
Abs (Med + Lev)	2,506	2,314	2,306	2,417	1,876	1,833	2,324	2,121	2,305
ufcx10 ⁷ /ml	30,088	27,683	27,378	28,828	22,060	21,322	27,429	25,215	27,276

R: Réplica

El exponente para cada levadura fue determinado por recuento de difusión en placa de las diluciones seriadas (Tabla 6, 7, 8).

Cálculo demostrativo:

Para la R1 de *M. pulcherrima* (Tabla 6).

Promedio

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n xi}{n} \quad Ec. 2$$

$$\bar{x} = \frac{298 - 296 - 290}{3} = 295$$

Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad Ec. 3$$

$$s = \sqrt{\frac{(298 - 295)^2 + (296 - 295)^2 + (290 - 295)^2}{3 - 1}} = 4,16$$

%Recuperación

$$\%R = \frac{\bar{x}}{ufc \times 10^7 / ml} * 100\% \quad Ec. 4$$

$$\%R = \frac{295}{300} * 100 = 98,22\%$$

%Coeficiente de Variación

$$\%CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100\% \quad Ec. 5$$

$$\%CV = \frac{4,16}{295} * 100 = 1,41\%$$

Tabla 6. Recuento en placa para la levadura *M. pulcherrima*

	Replica 1							Replica 2							Replica3						
	A1	A2	A3	\bar{x}	s	%R	%CV	B1	B2	B3	\bar{x}	s	%R	%CV	C1	C2	C3	\bar{x}	s	%R	%CV
Dil 6	298	296	290	295	4,16	98,22	1,41	279	286	280	282	3,79	102,05	1,34	266	272	268	268,67	3,06	98,17	1,14
Dil 7	27	30	29	29	1,53	95,56	5,33	26	25	29	27	2,08	96,62	7,81	25	23	27	25,00	1,63	92,59	6,53
Dil 8	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-

Dil: dilución; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; %CV: %coeficiente de variación; %R: % recuperación

Tabla 7. Recuento en placa para la levadura *L. sp.LE034*

	Replica 1							Replica 2							Replica3						
	A1	A2	A3	\bar{x}	s	%R	%CV	B1	B2	B3	\bar{x}	s	%R	%CV	C1	C2	C3	\bar{x}	s	%R	%CV
Dil 6	277	282	290	283	6,56	98,26	2,32	216	225	223	221	4,73	100,61	2,14	197	201	203	200	3,06	94,05	1,52
Dil 7	25	28	26	26	1,53	91,44	5,80	17	18	23	19	3,21	87,88	16,63	16	18	25	20	4,73	92,33	24,03
Dil 8	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-

Dil: dilución; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; %CV: %coeficiente de variación; %R: % recuperación

Tabla 8. Recuento en placa para la levadura *S. cerevisiae*

	Replica 1							Replica 2							Replica3						
	A1	A2	A3	\bar{x}	s	%R	%CV	B1	B2	B3	\bar{x}	s	%R	%CV	C1	C2	C3	\bar{x}	s	%R	%CV
Dil 6	269	274	268	270	3,21	98,66	1,19	249	253	246	249	3,51	98,94	1,41	268	263	301	277	20,65	101,96	7,45
Dil 7	23	27	24	25	2,08	90,02	8,44	23	24	24	24	0,58	93,92	2,44	27	30	26	28	2,08	101,72	7,52
Dil 8	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-

Dil: dilución; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; %CV: %coeficiente de variación; %R: % recuperación

Tabla 9. Tabla resumen del número de exponente para cada levadura

Levadura	Número de Exponente
<i>M. pulcherrima</i>	10 ⁷
<i>L. sp.LE034</i>	10 ⁷
<i>S. cerevisiae</i>	10 ⁷

La determinación del exponente para cada levadura dependió del recuento de difusión en placa, así pues, las tres levaduras tienen un exponente 10⁷ ya que los ufc/ml calculados mediante la curva McFarland para la dilución 10⁷ (Tabla 5) coinciden con el recuento experimental esperado. Para la dilución 10⁸ no hubo crecimiento (Tabla 6, 7, 8).

Con respecto a los parámetros estadísticos, la desviación estándar (s) indica que la dispersión entre los datos es mínima, es decir que entre réplicas los valores son parecidos. El porcentaje de recuperación (%R) indica que la curva McFarland funciona muy bien ya que entre los ufc calculados y los ufc por recuento en placa, el %R es mayor al 90%.

4.1.3. Determinación del factor de crecimiento

La tasa de crecimiento depende de la disponibilidad de nutrientes esenciales, como azúcares. Por esta razón se utilizó caldo YM debido al elevado contenido de carbohidratos como dextrosa y maltosa, que son esenciales para el crecimiento de las levaduras.

Tabla 10. Número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml) iniciales para el factor de crecimiento.

	<i>M. pulcherrima</i>			<i>L. sp.LE034</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Abs (Medio)	0,033	0,033	0,045	0,012	0,057	0,048	0,085	0,045	0,041
Abs (Med +Lev)	2,358	2,122	2,052	1,697	2,008	1,805	2,120	2,279	2,018
ufcx10 ⁷ /ml	28,000	25,000	23,960	19,860	23,240	20,770	24,310	26,840	23,570
ufcx10 ⁶ /ml	280,000	250,000	239,600	198,600	232,400	207,700	243,100	268,400	235,700

R: Réplica

Tabla 11. Número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml) de la dilución (10^7) después de 72 horas de la levadura *M. pulcherrima*.

	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
Abs (Medio)	0,034	0,034	0,034	0,022	0,022	0,022	0,046	0,046	0,046
Abs (Med + Lev)	1,030	1,041	1,046	1,333	1,070	1,046	1,121	1,137	1,142
ufcx 10^7 /ml	11,090	11,230	11,300	15,100	11,750	11,450	12,100	12,300	12,370
ufcx 10^6 /ml	111,000	112,000	113,000	151,000	118,000	114,000	121,000	123,000	124,000

Tabla 12. Número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml) de la dilución (10^7) después de 72 horas de la levadura *L. sp.LE034*

	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
Abs (Medio)	0,038	0,038	0,038	0,018	0,018	0,018	0,056	0,056	0,056
Abs (Med + Lev)	0,248	0,240	0,264	0,681	0,662	0,643	0,275	0,643	0,350
ufcx 10^7 /ml	1,090	0,990	1,300	6,860	6,610	6,370	1,210	5,890	2,160
ufcx 10^6 /ml	11,000	10,000	13,000	69,000	66,000	64,000	12,000	59,000	22,000

Tabla 13. Número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml) de la dilución (10^7) después de 72 horas de la levadura *S. cerevisiae*

	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
Abs (Medio)	0,065	0,065	0,065	0,038	0,038	0,038	0,043	0,043	0,043
Abs (Med + Lev)	0,780	0,892	0,606	1,359	1,210	1,371	0,773	0,710	1,145
ufcx 10^7 /ml	7,520	8,940	5,300	15,230	13,330	15,380	7,710	6,910	12,440
ufcx 10^6 /ml	75,000	89,000	53,000	152,000	133,000	154,000	77,000	69,000	124,000

En la Tabla 10, se calculó las ufc/ml iniciales de la dilución 10^7 para conocer la concentración de la cual partimos. En las tres levaduras existió crecimiento después de las 72 horas (Tabla 11, 12, 13) y se calculó un estimado de ufc/ml, lo que se confirmó con el recuento en placa (Tabla 14,15, 16).

Tabla 14. Recuento en placa de levadura *M. pulcherrima* después de las 72 horas (10^7)

	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
\bar{x}	4,300	4,700	5,000	4,000	5,000	4,300	5,700	5,000	6,000
s	0,580	0,580	1,000	1,000	1,000	0,580	0,580	1,000	1,000
%CV	13,320	12,370	20,000	25,000	20,000	13,320	10,190	20,000	16,670

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; %CV: %coeficiente de variación

Tabla 15. Recuento en placa de levadura *L. sp.LE034* después de las 72 horas (10^7)

	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
\bar{x}	1,700	0,700	0,700	4,300	5,300	6,000	1,300	1,700	1,000
s	0,580	0,580	0,580	0,580	1,530	1,000	0,580	0,580	1,000
%CV	34,640	86,600	86,600	13,320	28,640	16,670	43,300	34,640	100,000

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; %CV: %coeficiente de variación

Tabla 16. Recuento en placa de levadura *S. cerevisiae* después de las 72 horas (10^7)

	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
\bar{x}	10,670	9,330	7,330	9,670	7,670	9,000	5,330	6,000	9,670
s	1,530	0,580	1,530	2,080	2,520	2,000	1,150	1,000	1,530
%CV	14,320	6,190	20,830	21,530	32,830	22,220	21,650	16,670	15,800

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; %CV: %coeficiente de variación

Tabla 17. Factores de crecimiento real y proyectado para cada levadura

Especies de Levaduras	F. C Proyectado (Curva McFarland)	F. C real (Recuento en placa)	Rango de crecimiento Proyectado (Curva McFarland)		Rango de crecimiento real (Recuento en placa)	
			Mín	Máx	Mín	Máx
<i>M. pulcherrima</i>	2,18E+07	4,89E+07	1,01E+07	3,78E+07	4,00E+07	6,00E+07
<i>L. sp.LE034</i>	1,47E+07	2,56E+07	0,55E+07	2,94E+07	1,00E+07	6,00E+07
<i>S. cerevisiae</i>	1,26E+07	8,22E+07	0,75E+07	1,71E+07	5,00E+07	10,0E+07

F.C: Factor de crecimiento

El factor de crecimiento nos permite determinar cuánto aumentan o decrecen las unidades formadoras de colonia (ufc) ante condiciones adversas. En la Tabla 17 se ha calculado el rango mínimo y máximo del crecimiento real mediante difusión de placa y el crecimiento proyectado mediante la curva McFarland.

4.1.4. Determinación de inhibición de crecimiento de las levaduras frente a cadmio

Cálculo demostrativo:

Para la concentración de 107 µg/ml Cd de *M. pulcherrima* (Tabla 18).

Crecimiento esperado

$$CE = \frac{ufc}{ml} * \text{Factor de crecimiento levadura} \quad Ec. 6$$

$$CE = 23 * 4,89E + 07$$

$$CE = 112E + 07$$

Porcentaje de crecimiento

$$\begin{array}{l} CE \text{ -----} 100\% \\ ufc/ml (72 \text{ horas}) \text{ -----} x \end{array} \quad Ec.7$$

$$\%Crecimiento = \frac{3,713 * 100\%}{112E + 07}$$

$$\%Crecimiento = 3,32\%$$

Porcentaje de inhibición

$$\%Inhibición = 100\% - \% Crecimiento \quad Ec. 8$$

$$\%Inhibición = (100 - 3,32)\%$$

$$\%Inhibición = 96,68\%$$

Tabla 18. Inhibición de crecimiento de *M. pulcherrima* frente a cadmio (600nm)

Cd (µg/ml)	ufc inoculados/ml	CE (ufc/ml)	Abs. (iniciales)	Abs. (72 horas)	ufc/ml (72 horas)	% de crecimiento	% inhibición
107,000	23,000	112E+07	0,031	0,011	No hay crecimiento	-	-
85,600			0,028	0,018	No hay crecimiento	-	-
64,200			0,028	0,079	No hay crecimiento	-	-
42,800			0,025	0,416	3,713E+07	3,320	96,680
21,400			0,027	0,965	10,698E+07	9,550	90,450
10,700			0,023	1,236	14,146E+07	12,630	87,370

CE: Crecimiento esperado

Tabla 19. Inhibición de crecimiento de *L. sp.LE034* frente a cadmio (600 nm)

Cd (µg/ml)	ufc inoculados/ml	CE (ufc/ml)	Abs. (iniciales)	Abs. (72 horas)	ufc/ml (72 horas)	% de crecimiento	% inhibición
42,800	23,000	58,9E+07	0,035	0,045	No hay crecimiento	-	-
21,400			0,035	0,062	No hay crecimiento	-	-
10,700			0,034	0,181	7,23E+06	0,650	99,350
6,420			0,031	0,216	1,169E+07	1,040	98,960
2,140			0,031	0,421	3,777E+07	3,370	96,630
1,070			0,030	0,440	4,079E+07	3,640	96,360

CE: Crecimiento esperado

Tabla 20. Inhibición de crecimiento de *S. cerevisiae* frente a cadmio (600nm)

Cd (µg/ml)	ufc inoculados/ml	CE (ufc/ml)	Abs. (iniciales)	Abs. (72 horas)	ufc/ml (72 horas)	% de crecimiento	% inhibición
107,000	21,000	173E+07	0,036	0,047	No hay crecimiento	-	-
85,600			0,035	0,339	2,73E+07	2,440	97,560
64,200			0,036	0,463	4,31E+07	3,850	96,150
42,800			0,032	0,505	4,85E+07	4,330	95,670
21,400			0,030	0,544	5,34E+07	4,770	95,230
10,700			0,030	0,840	9,11E+07	8,130	91,870

CE: Crecimiento esperado

A pesar de que ciertas levaduras tienen la capacidad de crecer en ambientes contaminados con altas concentraciones de metales pesados, la presencia de Cd afecta severamente el crecimiento, inhibiendo el crecimiento de las levaduras en una tasa porcentual desde el 85% al 95%. En el caso de *S. cerevisiae* y *M. pulcherrima* estas levaduras toleran concentraciones mayores (107 – 10,7 µg/l) que *L. sp.LE034* (42,8 – 1,07 µg/l) (Tabla 18, 19, 20).

4.1.5. Elaboración de curva de análisis de cadmio

Para la curva de análisis de cadmio por el método de la ditizona, se empleó la metodología descrita en el numeral 3.2.6, se midió la absorbancia a 518 nm (Tabla 21). Se determinó la estimación lineal (Anexo H) y la ecuación de la curva McFarland (Gráfico 2).

Tabla 21. Absorbancia (Abs) de la curva de análisis de cadmio por el método de la ditizona de la ditizona

Réplica	Cd (µg/ml)	Abs (518 nm)
Réplica 1	0	0,009
	107	0,234
	214	0,631
	321	0,988
	428	1,265
Réplica 2	0	0,006
	107	0,303
	214	0,580
	321	0,991
	428	1,317
Réplica 3	0	0,005
	107	0,256
	214	0,642
	321	0,895
	428	1,293

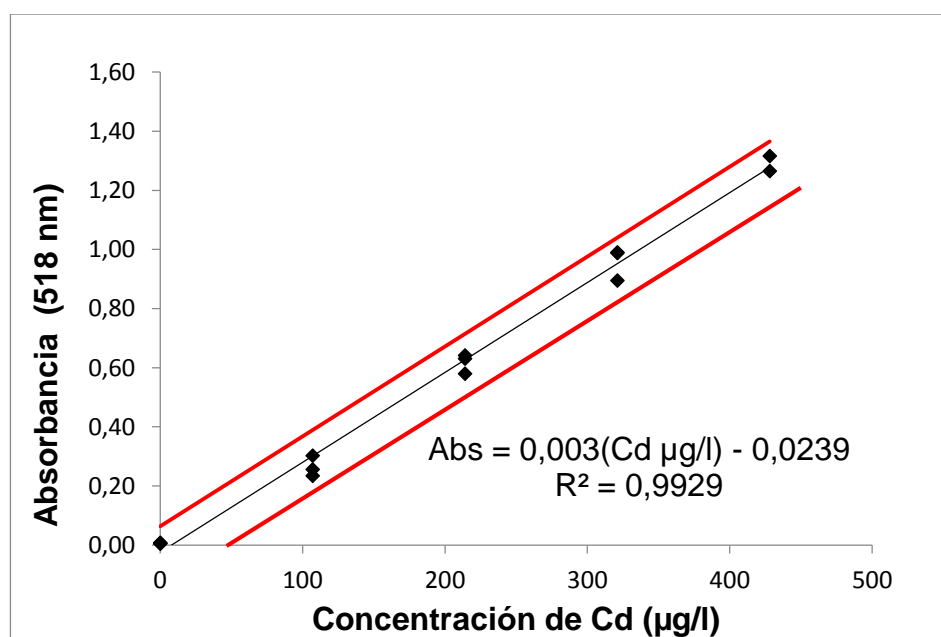


Gráfico 2. Curva de análisis de cadmio por el método de la ditizona

4.1.6. Comparación entre el método de ditizona y absorción atómica para análisis de cadmio

Para demostrar que el método de la ditizona fue eficaz y proporcionaba resultados confiables, se analizó si existe diferencia significativa previa y posterior a la de la digestión y entre el método de la ditizona con el de absorción atómica (Tabla 22, 23, 24).

Tabla 22. Estándares de 214 µg/l antes y después de la digestión por el método de la ditizona y por absorción atómica

# Estándar	Método de la ditizona		Absorción atómica
	Antes de la digestión (µg/l)	Después de la digestión (µg/l)	Después de la digestión (µg/l)
1	175,000	183,000	170,000
2	183,000	175,000	150,000
3	170,000	174,000	300,000
4	172,000	170,000	250,000
5	173,000	169,000	150,000
6	171,000	167,000	180,000

Tabla 23. Soluciones de 107 µg/l antes y después de la digestión por el método de la ditizona y por absorción atómica

# Solución	Método de la ditizona		Absorción atómica
	Antes de la digestión (µg/l)	Después de la digestión (µg/l)	Después de la digestión (µg/l)
1	162,000	158,000	200,000
2	157,000	161,000	150,000
3	146,000	162,000	120,000
4	164,000	172,000	130,000
5	169,000	174,000	110,000

Tabla 24. Muestras con biomasa de levaduras antes y después de la digestión por el método de la ditizona y por absorción atómica

# Muestras	Método de la ditizona		Absorción atómica
	Antes de la digestión (µg/l)	Después de la digestión (µg/l)	Después de la digestión (µg/l)
1	111,000	144,000	320
2	67,000	129,000	410
3	141,000	344,000	740
4	62,000	107,000	250
5	92,000	124,000	90
6	91,000	76,000	90

La prueba t para medias de dos muestras emparejadas indica que no existe diferencia significativa en las concentraciones de cadmio antes y después de la digestión. En los estándares de 214 µg/l, las soluciones de 107 µg/l y las muestras con biomasa, el t estadístico calculado es menor que el t tabulado (Anexos I, J, K).

Al comparar estadísticamente los datos mediante los dos métodos para determinar la concentración de cadmio, la prueba t para medias de dos muestras emparejadas, esté señaló que no existe diferencia significativa entre el método de la ditizona y el de absorción atómica. En los estándares de 214 µg/l, las soluciones de 107 µg/l y las muestras con biomasa el t estadístico calculado es menor que el t tabulado (Anexo L, M, N).

Sobre la base de estos resultados, se puede afirmar que las diferencias entre los valores promedio encontrados mediante espectrofotometría UV/VIS (método de ditizona) y absorción atómica, se produjeron debido a errores aleatorios principalmente. La variabilidad en la determinación de cadmio es pequeña, estadísticamente se comprobó que la media de los resultados de este método es igual a la concentración de referencia obtenida mediante absorción atómica.

4.1.7. Remoción de cadmio mediante levaduras

En el proceso de biosorción de cadmio mediante las levaduras se consideró un pH entre 5 - 6 y la temperatura alrededor de los 28°C como parámetros

críticos, ya que según **Acosta et al. (2007)** el pH óptimo para la remoción de Cd con biomasa fúngica se encuentra entre 5 - 6 y con una temperatura de 28°C.

4.1.7.1. Interferencias detectadas

Tabla 25. Interferencia del caldo YM

Replicas	Std. 107µg/l (caldo YM)		Std. 107µg/l (Agua destilada)	
	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)
1	0,465	162,970	0,278	100,630
2	0,440	154,630	0,303	108,970
3	0,485	169,630	0,286	103,300

Std: Estándar

La lectura del estándar de 107 µg/l en los dos medios, agua destilada y caldo YM está descrita en la Tabla 25. La coloración del caldo YM afecta la lectura de la absorbancia y por ende la concentración leída va a ser menor que la concentración calculada. Por el contrario se comprobó que el agua destilada no interfiere con la lectura de absorbancia.

Tabla 26. Interferencia de la centrifuga en caldo YM

Réplicas	Std. 107µg/l (Sin centrifugado)		Std. 107µg/l (Centrifugado) 4000 rpm* 10min		Std. 107µg/l (Centrifugado) 2500 rpm* 10min	
	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)
1	0,465	162,97	-0,139	0,000	-0,016	0,000
2	0,44	154,63	-0,175	0,000	-0,277	0,000
3	0,485	169,63	-0,104	0,000	-0,133	0,000

Std: Estándar

Se consideró a la centrifugación como otro interferente, ya que en la solución de 107 µg/l preparada en caldo YM, el metal es enmascarado dentro del medio y por efecto de la fuerza centrífuga, precipita; por esta razón las absorbancias indican que no existe presencia de cadmio (Tabla 27).

Tabla 27. Interferencia de la centrífuga en agua destilada.

Réplicas	Std. 107µg/l (Sin centrifugado)		Std. 107µg/l (Centrifugado) 4000 rpm* 10min		Std. 107µg/l (Centrifugado) 2500 rpm* 10min	
	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)
1	0,283	105,3	0,279	103,97	0,280	104,300
2	0,295	109,3	0,282	104,97	0,299	110,630
3	0,290	107,6	0,269	100,63	0,289	107,300

Std: Estándar

El efecto de la centrifugación evaluado en el estándar preparado con agua destilada, demuestra que el cadmio no es enmascarado y permanece en la solución por lo que el efecto de la fuerza centrífuga no lo afecta. Al evaluar las distintas velocidades 4000 y 2500 rpm se aprecia que las lecturas de las muestras son menos dispersas en la velocidad de 4000 rpm, por lo que esta última velocidad fue la utilizada en el proceso de remoción.

La interferencia debido al proceso de centrifugación se da únicamente cuando la solución de 107 µg/l es preparada en caldo YM. Esto puede deberse a que debido a su composición química existe un intercambio iónico entre los componentes del medio y el metal. Además, según la ley de Stokes las partículas se sedimentan fácilmente cuando es mayor su peso específico y diámetro.

Tabla 28. Interferencia de la biomasa

Réplicas	Std. 107µg/l (caldo YM)		Std. 107µg/l + biomasa de levadura	
	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)
1	0,465	162,970	0,465	162,290
2	0,440	154,630	0,485	169,630
3	0,485	169,630	0,480	167,970

Std: Estándar

En la Tabla 28 se aprecia que el caldo YM interfiere con la lectura de la concentración y que la biomasa aplicada en el estándar, no provoca ninguna

interferencia en la concentración ya que ambas concentraciones son muy similares.

Tabla 29. Interferencia de la filtración en caldo YM

Réplicas	Std. 107µg/l (sin filtrar)		Std. 107µg/l (filtrado en papel filtro cualitativo)	
	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)
1	0,465	162,97	-0,589	0,000
2	0,440	154,63	-0,620	0,000
3	0,485	169,63	-0,580	0,000

Std: Estándar

Tabla 30. Interferencia de la filtración en agua destilada.

Réplicas	Std. 107µg/l (Sin filtrar)		Std. 107µg/l (filtrado en papel filtro cualitativo)	
	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)	Abs (518 nm)	Cd (µg/l)
1	0,287	106,600	0,175	69,300
2	0,290	107,600	0,183	72,000
3	0,288	107,000	0,179	70,600

Std: Estándar

Las Tablas 29 y 30 indican que el estándar, ya sea preparado en agua destilada o en caldo YM, es afectado por la filtración. En el caldo YM es más notorio la interferencia ya que altera completamente la detección del metal.

4.1.7.2. Pruebas preliminares

Para establecer la capacidad de remoción, se evaluaron alícuotas del metal durante un periodo de 24 horas para las tres levaduras (Tabla 31).

Tabla 31. Pruebas preliminares de remoción de cadmio

Levadura	Cd inicial (µg/l)	Concentración de cadmio (µg/l)				
		Tiempo (Horas)				
		0,16	3	6	9	24
<i>L. sp.LE034.</i>	34938,890	2848,330	1437,620	1757,700	1646,990	1992,410
<i>M. pulcherrima</i>	34938,890	24883,330	1524,170	1132,920	599,580	2449,670
<i>S. cerevisiae</i>	34938,890	3058,370	859,670	469,670	401,200	450,530

El aumento a las 24 horas, podría deberse a que existe una sobresaturación del metal en la pared celular. Según **Sandoval (2006)** el proceso de eliminación de metales pesados mediante la biosorción con microorganismos es continuo, hasta que se establece un equilibrio entre la concentración del metal pesado disuelto y el biosorbido por la biomasa.

4.1.7.3. Remoción de cadmio

Para los controles de calidad, estándares de 214 µg/l fueron leídos antes de cada ensayo del proceso de remoción (Tabla 32), considerando el 25% del valor esperado ($\pm 53,5$ µg/l).

Tabla 32. Controles de calidad (estándares de 214 µg/l) en la remoción de cadmio por réplica de levadura.

	Cd (µg/l)			Criterio de aceptación ($\pm 53,5$ µg/l)
	<i>M. pulcherrima</i>	<i>L.sp.LE034</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
Réplica 1	165,960	174,960	165,960	160,500 - 267,500
Réplica 2	174,960	187,300	174,960	
Réplica 3	174,300	189,310	174,300	

Los controles de calidad en cada una de las réplicas cumplieron con el criterio de aceptación de acuerdo al valor esperado (Tabla 32) por lo que se procedió a la evaluación del proceso de remoción por triplicado. Para las especies *S. cerevisiae* y *M. pulcherrima* se evaluaron las alícuotas en laspsos de tiempo (0,16; 3; 6 y 9 horas). Para la levadura *L. sp.LE034* las alícuotas se tomaron a las 0,16; 1; 2 y 3 horas debido a que en la prueba preliminar de las 24 horas (Tabla 31) la mayor remoción ocurre entre este periodo de tiempo (ANEXO O, P, Q)

La Tabla 33 indica que las levaduras aisladas del volcán Tungurahua, así como la levadura comercial utilizada de manera referencial son capaces de remover el metal. En los primeros 10 minutos (0,16 horas) las levaduras *S. cerevisiae* y *L. sp.LE034* remueven eficientemente entre el 88 y 89% el metal.

De manera menos eficiente, la levadura *M. pulcherrima* remueve tan solo un 35% del Cd.

Tabla 33. Cuadro resumen del porcentaje de remoción de cadmio

	% remoción de Cd ($\mu\text{g/l}$)				Levadura
Tiempo (h)	0,16	3	6	9	
\bar{x} (%)	89,030	94,270	94,990	95,170	<i>S. cerevisiae</i>
s	2,770	2,990	3,320	3,350	
%CV	3,120	3,170	3,500	3,520	
Tiempo (h)	0,16	3	6	9	
\bar{x} (%)	35,270	92,490	93,950	96,180	<i>M. pulcherrima</i>
s	5,740	3,180	4,170	3,690	
%CV	16,270	3,430	4,430	3,830	
Tiempo (h)	0,16	1	2	3	
\bar{x} (%)	88,660	92,070	93,560	94,430	<i>L.sp.LE034</i>
s	3,680	1,780	0,680	0,460	
%CV	4,150	1,940	0,730	0,480	

\bar{x} : promedio; s: desviación estándar; %CV: %coeficiente de variación

Al final de la remoción todas llegan a alcanzar una remoción de tipo asintótica (gráfico 3, 4, 5) ya que se crea un equilibrio entre el metal presente en la solución y el metal absorbido por la levadura.

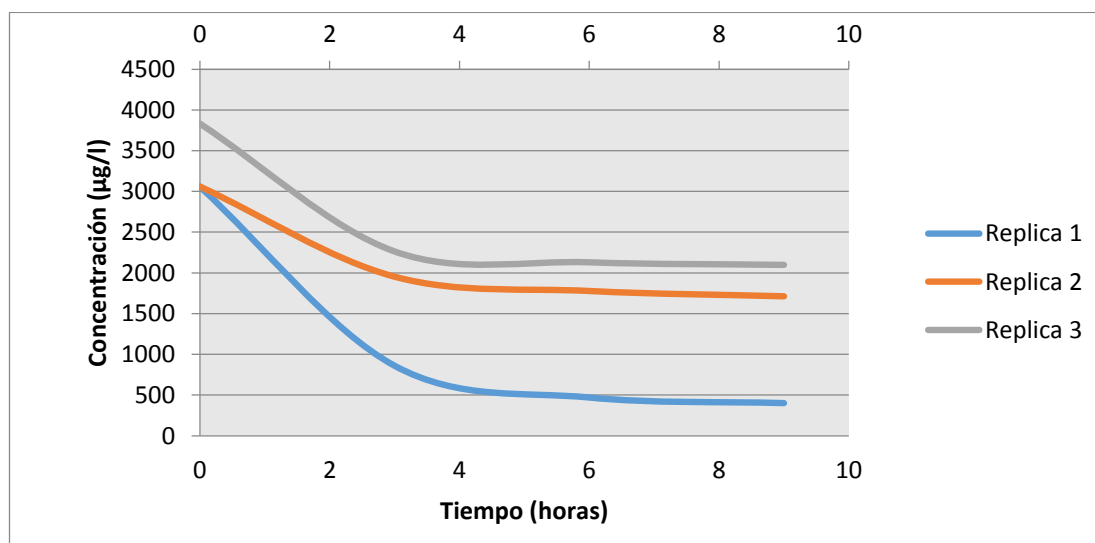


Gráfico 3. Remoción de cadmio mediante *S. cerevisiae*

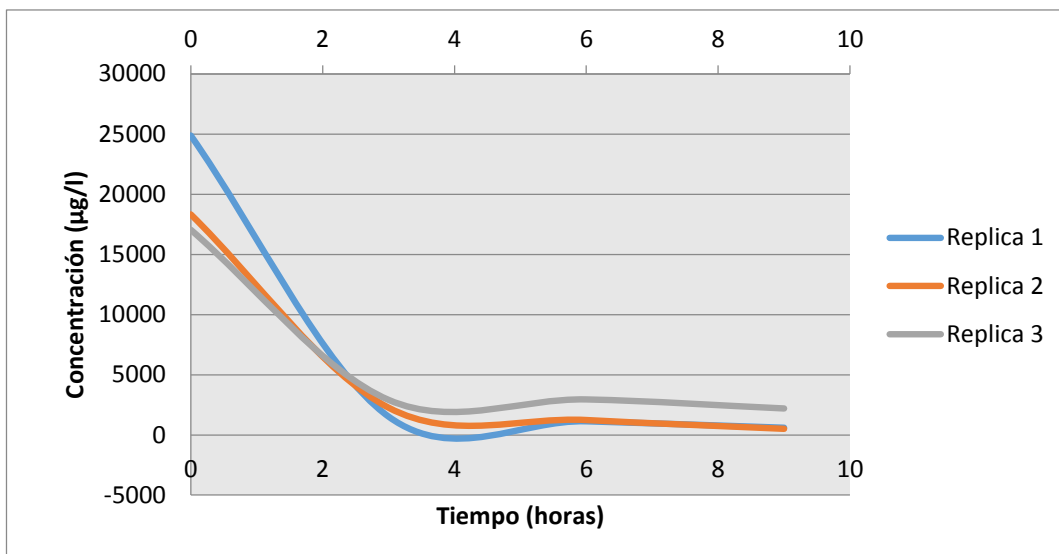


Gráfico 4. Remoción de cadmio mediante *M. pulcherrima*

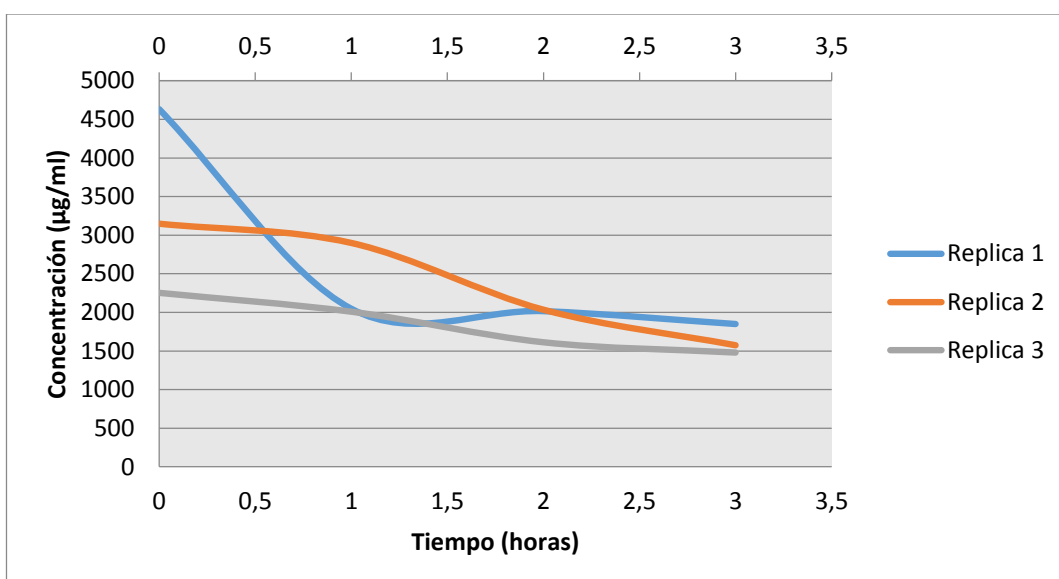


Gráfico 5. Remoción de cadmio mediante *L. sp.LE034*

4.1.7.4. Análisis de varianza de los porcentajes de remoción de cadmio por las tres levaduras.

Se aplicó el análisis de varianza de un factor con un nivel de significancia de 0,05 para comparar los datos de remoción de cadmio entre los períodos evaluados en las tres levaduras.

Para la levadura *S. cerevisiae* el proceso de remoción entre las 0,16; 3; 6 y 9 horas indica que no existe diferencia significativa entre las medias del

porcentaje de remoción (Anexo R). Para las levaduras *M. pulcherrima*, *L. sp.LE034*, al 0,05 de significancia existe diferencia significativa entre horas (Anexo S, T) por lo que se evaluó por el test estadístico de Tukey estas diferencias (Anexo U, V).

Cálculo demostrativo

Tukey para *M. pulcherrima* (Anexo U).

HSD: Diferencia honestamente significativa

Multiplicador: Valores de la Tabla de Tukey

Ms: Cuadrado del error medio

n: Número de elementos del grupo

Multiplicador = 4,04

$$Ms = \frac{\text{Suma de cuadrados dentro del grupo}}{\text{Grados de libertad dentro del grupo}}$$

$$Ms = \frac{147,96}{8} \equiv 18,49$$

$$HSD = \text{Multiplicador} * \sqrt{\frac{Ms}{n}}$$

$$HSD = 4,04 * \sqrt{\frac{18,49}{3}}$$

$$HSD = 10,03$$

En el Anexo U para la levadura *M. pulcherrima* se aprecia que existe diferencia significativa entre las alícuotas del primer tiempo evaluado (0,16 h) y las de los 3 últimos tiempos evaluados (3, 6, 9 h). Esto debido a que los valores calculados son mayores a la diferencia honestamente significativa (HSD). El porcentaje de remoción al inicio es del 35% para luego estabilizarse entre un 90 - 97%.

En el Anexo V para la levadura *L. sp.LE034* se observa que existe diferencia significativa entre las alícuotas del primer lapso 0,16 h y de los dos siguientes

lapsos (2 y 3 h) debido a que los valores calculados son mayores a la diferencia honestamente significativa e indica que a las 3 h de iniciada la evaluación se estabilizó la remoción del metal.

4.1.7.5. Capacidad de remoción a concentración baja

Al tener porcentajes de remoción altos de Cd (Tabla 33) partiendo de una solución de 34938 µg/l Cd, se evaluó la remoción de Cd utilizando una concentración menor de 1827 µg/l Cd, tomando alícuotas a las 0,16 y 3 horas para la lectura en el espectrofotómetro de UV- Visible (Tabla 34).

Tabla 34. Remoción de cadmio a concentraciones bajas

Levadura	Cd Inicial (µg/ml)	Cd (µg/l)	
		Tiempo (Horas)	
		0,16	3
<i>M. pulcherrima</i>	1827,22	108,63	23,30
<i>L. sp.LE034</i>		45,63	0,00
<i>S. cerevisiae</i>		82,30	8,63

Tabla 35. Porcentaje de remoción de cadmio a concentraciones bajas

	Porcentaje remoción (%)	
	Tiempo (Horas)	
	0,16	3
<i>M. pulcherrima</i>	94,05	98,72
<i>L. sp.LE034</i>	97,50	100,95
<i>S. cerevisiae</i>	95,50	99,53

A concentraciones bajas, las levaduras absorben de mejor manera el metal de la solución y la remoción es casi inmediata ya que a las 0,16 horas se eliminó un 94% de Cd y a las 3 horas la remoción alcanzó prácticamente el 100% (Tabla 35).

4.1.7.6. Capacidad de supervivencia de levaduras en el proceso de remoción

El porcentaje de supervivencia fue determinado mediante la inoculación de las diluciones de la tercera réplica del proceso de remoción (Tabla 36). A las 0,16 y 3 horas para la levadura *L. sp.LE034* y *M. pulcherrima* (Tablas 37 y 38), para *S. cerevisiae* a las 0,16 y 9 horas (Tabla 39).

Tabla 36. Número de unidades formadoras de colonias inoculadas inicialmente de la tercera réplica para supervivencia (ufc /ml).

	<i>L.sp.LE034</i>	<i>M. pulcherrima</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Abs (Med + Lev)	1,332	1,363	1,317
ufcx10 ⁷ /ml	15,367	15,762	15,176

Tabla 37. Supervivencia frente a cadmio para la levadura *L.sp.LE034*

Horas	Recuento esperado	Dilución	R1	R2	R3	\bar{x}	s	CV	% supervivencia
0,16	150	Dil 5	42	39	40	40	1,530	0,040	26,890
3	1500	Dil 4	116	120	118	118	2,000	0,020	7,870
	150	Dil 5	22	24	20	22	2,000	0,090	14,670

R: Réplica; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; %CV: %coeficiente de variación

Tabla 38. Supervivencia frente a cadmio para la levadura *M. pulcherrima*

Horas	Recuento esperado	Dilución	R1	R2	R3	\bar{x}	s	CV	% supervivencia
0,16	150	Dil 5	16	19	18	18	1,530	0,090	11,780
9	1500	Dil 4	74	63	60	66	7,370	0,110	4,380
	150	Dil 5	8	10	11	10	1,530	0,160	6,440

R: Réplica; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; %CV: %coeficiente de variación

Tabla 39. Supervivencia frente a cadmio para la levadura *S. cerevisiae*

Horas	Recuento esperado	Dilución	R1	R2	R3	\bar{x}	s	CV	% supervivencia
0,16	150	Dil 5	9	12	10	10	1,530	0,150	6,890
9	1500	Dil 4	21	18	20	20	1,530	0,080	1,310
	150	Dil 5	8	6	6	7	1,150	0,170	4,440

R: Réplica; \bar{x} : promedio; s: desviación estándar; %CV: %coeficiente de variación

El porcentaje de supervivencia de las tres levaduras indica que a tiempo de contacto de 0,16 horas en la dilución 10^5 para *L.sp.LE034* fue del 26%. Para *M. pulcherrima* el 12% y para *S. cerevisiae* solo el 7%, en el mismo período a las tres horas el porcentaje de supervivencia fue solamente de 14%, 6% y 4% respectivamente. Mediante los resultados de la supervivencia en la dilución 10^5 de la alícuota tomada a la última hora (Tabla 37, 38, 39) y la capacidad de remoción de las tres levaduras, se calcularon las ufc necesarias para biosorber 1 μg de cadmio (Tabla 40).

Tabla 40. Número de unidades formadoras de colonia (ufc) necesarias para biosorber 1 μg de cadmio.

Levadura	Réplica	ufc/40 ml (E+05)	μg Cd removido/ 1000 ml	μg Cd removido/ 40 ml	% supervivencia (dil 5)	cantidad removida	ufc necesarios/ μg Cd
<i>S. cerevisiae</i>	1	6324,000	34537,690	1381,510	96,000	6,07E+08	4,39E+05
	2	6424,000	28671,100	1146,840		6,17E+08	5,38E+05
	3	6068,000	25118,530	1004,740		5,83E+08	5,80E+05
<i>M. pulcherrima</i>	1	6264,000	34339,310	1373,570	94,000	5,89E+08	4,29E+05
	2	6269,000	29875,240	1195,010		5,89E+08	4,93E+05
	3	6304,000	25017,470	1000,700		5,93E+08	5,92E+05
<i>L. sp.LE034</i>	1	6055,000	28534,160	1141,370	85,000	5,15E+08	4,51E+05
	2	6035,000	27475,830	1099,030		5,13E+08	4,67E+05
	3	6147,000	26904,000	1076,160		5,22E+08	4,86E+05

4.2. Verificación de hipótesis

Luego de analizar y discutir los resultados, se acepta la hipótesis nula la cual plantea que si existe remoción de cadmio mediante las levaduras *Metschnikowia pulcherrima*, *Lecythophora sp.LE034*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se evaluó la capacidad de remoción de cadmio mediante el uso de dos levaduras aisladas del volcán Tungurahua (*Metschnikowia pulcherrima*, *Lecythophora sp.LE034*) y utilizando como referencia una levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* bajo parámetros controlados de pH y temperatura se determinó que las tres levaduras son eficientes para esta tarea ya que por su mecanismo de biosorción pueden acumular entre el 88% – 89% del metal.

Mediante la elaboración de la curva McFarland se determinó el número de ufc/ml de las levaduras seleccionadas, con este valor se estableció el factor de crecimiento real y proyectado, así como el número de exponente (10^7) que fue el mismo para las tres levaduras.

Se determinó que el porcentaje de inhibición de las levaduras frente al cadmio está entre el 85% y 95% a distintas concentraciones, siendo la levadura *Lecythophora sp.LE034* la más susceptible ya que tolera concentraciones muy bajas (42,8 -1,07 $\mu\text{g/l}$) del metal.

5.2. Recomendaciones

- Evaluar posibles interferentes en el proceso de remoción, ya que puede provocar lecturas erróneas de la concentración de cadmio en el proceso de biosorción.
- Comparar el método colorimétrico de la ditizona para la determinación de cadmio por otros métodos instrumentales como el de absorción atómica para determinar si existe diferencias significativas entre ambos métodos.
- Ampliar el estudio sobre el efecto de parámetros como la temperatura, pH en el proceso de remoción de cadmio mediante levaduras aisladas del volcán Tungurahua.

Referencias Bibliográficas

Acosta, I., Moctezuma-Zárate, M. D. G., Cárdenas, J. F. & Gutiérrez, C. (2007). Bioadsorción de cadmio (II) en solución acuosa por biomasas fúngicas. *Información tecnológica*, 18(1), 09-14.

Anand, P., Isar, J., Saran, S. & Saxena, R. K. (2006). Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 97(8), 1018-1025.

Brady, D., Stoll, A. & Duncan, J. R. (1994). Biosorption of heavy metal cations by non-viable yeast biomass. *Environmental Technology*, 15(5), 429-438.

Brookhaven National Laboratory. (2000). Scientists combine chemistry and bioremediation to clean cadmium from soil. Science Daily. Retrieved November 26, 2015 from www.sciencedaily.com

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

Casamorin, J. A., Bennett, R. & Dedeles, G. (2014). Biosorption of Cd (II) by Yeasts from Ripe Fruit Peels in the Philippines. *Journal of Health Pollution*, 4(7), 14-24.

Corona, J. F. G., Saldaña, Á. E. E., Alonso, A. C., Aguilar, F. J. A., López, G. E. R., Fernández, F. J. & Wrobel, K. (2010). Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 1(1), 47-63.

Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R. & Paul, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7(2), 2189-2212.

Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R. K. & Mohapatra, H. (2000). Microbial biosorbents: meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Current Science-Bangalore*, 78(8), 967-973.

Halttunen, T. (2008). Removal of cadmium, lead and arsenic from water by lactic acid bacteria. Functional Foods Forum; Department of Biochemistry and Food Chemistry.

Hidalgo, K. (2015). Primer estudio sobre la diversidad de levaduras asociada a un volcán: Tungurahua, Ecuador (Tesis de Grado). Universidad Técnica de Ambato, Ambato - Ecuador.

Joya, M., & Milagros, S. (2008). Acción inhibitoria de la Lidocaina en concentraciones al 1%, 2% y 5% sobre el crecimiento de especies oportunistas tipo levadura. Valencia 2006-2008.

Kaszycki, P., Fedorovych, D., Ksheminska, H., Babyak, L., Wójcik, D. & Koloczek, H. (2004). Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. *Microbiological Research*, 159(1), 11-17.

Ksheminska, H., Jaglarz, A., Fedorovych, D., Babyak, L., Yanovych, D., Kaszycki, P. & Koloczek, H. (2003). Bioremediation of chromium by the yeast *Pichia guilliermondii*: toxicity and accumulation of Cr (III) and Cr (VI) and the influence of riboflavin on Cr tolerance. *Microbiological research*, 158(1), 59-67.

Macaskie, L. E. (1990). An immobilized cell bioprocess for the removal of heavy metals from aqueous flows. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 49(4), 357-379.

Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment international*, 30(2), 261-278.

Moreno, C. M., Becerra, A. G. & Santos, M. J. B. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev Iberoam Micol*, 21(1), 103-120.

Martin, A. & Palomino, J. C. (2012). Procedure manual. Thin Layer Agar (TLA). Microcolony detection. Rapid culture of *Mycobacterium tuberculosis*.

Ministerio del Ambiente Ecuador. Información de Plomo y Cadmio. (s.f). Recuperado el 26/11/2015, de www.ambiente.gob.ec

Rajendran, P., Muthukrishnan, J. & Gunasekaran, P. (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian journal of experimental biology*, 41(9), 935-944.

Trama, B., Fernandes, J. D. S., Labuto, G., de Oliveira, J. C. F., Viana-Niero, C., Pascon, R. C. & Vallim, M. A. (2014). The evaluation of bioremediation potential of a yeast collection isolated from composting. *Advances in Microbiology*, 4(12), 796.

Sandoval, G. M. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1), 77-99.

Zabochnicka-Świątek, M. & Krzywonos, M. (2014). Potentials of biosorption and bioaccumulation processes for heavy metal removal. *Mercury*, 6(5,245), 1-145.

ANEXOS

Anexo A: Estrías compuestas de las levaduras



Anexo B: Modificación del método de análisis colorimétrico para la determinación de cadmio por el método de la ditizona (Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0982)

Reactivo (Solución)	Modificación Método (Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0982)	Método (Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0982)	Factor de Reducción
Muestra	2 ml	200 ml	1: 100
HCl (Ácido Clorhídrico)	5 µl (0,005 ml)	0,5 ml	1: 100
Solución Azul de Timol	20 µl	Gotas	-
NaOH Hidroxido de Sodio 6N	8 – 10 µl	Gotas	-
Solución Tartrato de Sodio y potasio	100 µl	1 ml	1: 100
Solución I (NaOH-KCN)	0,5 ml	5 ml	1: 10
Solución Clorhidrato de hidroxilamina	100 µl (0,1 ml)	1 ml	1: 10
Solución ditizona	1,5 ml	15 ml	1: 10
Solución Ácido Tartárico	2,5 ml	25 ml	1: 10

Reactivo (Solución)	Modificación Método (Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0982)	Método (Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0982)	Factor de Reducción
Cloroformo	1 ml	10 ml	1: 10
Solución Clorhidrato de hidroxilamina	25 μ l (0,025 ml)	0,25 ml	1: 10
Solución Ditizona (Residuo)	1,5 ml	15 ml	1: 10
Solución II (NaOH-KCN)	0,5 ml	5 ml	1: 10

Anexo C: Reacción colorimétrica por el método de la Ditizona



Anexo D: Lectura muestras en espectrofotómetro UV- Visible



Anexo E: Preparación frascos para evaluación de remoción de Cadmio



Anexo F: Agitación de las muestras



Anexo G: Estimación lineal de la curva McFarland

Parámetro de control	Símbolo	Valor
Pendiente	m	0,079
Desv.est. Pendiente	Sm	0,001
Coefficiente de correlación ²	R2	0,993
Algoritmo	Fisher	3095,730
t de student	t	2,074
Límite superior	Lo.sup.	0,223
Límite inferior	Lo.inf.	0,025
Ordenada al origen	Lo	0,124
Desv. de la ordenada	Slo	0,018
Error tipo	Sy,x	0,048
n-2	grados de libertad	22,000
lím. Detec. (abs)	L.D (Abs)	0,161
Interpolación lím. Det (µg/ml)	L.D (conc)	0,468
lím. Cuantificación (abs)	L.C (Abs)	0,223
Interpolación lím cuant (µg /ml)	L.C (conc)	1,255
Unidades de conc.	Sx,y	0,605

Anexo H: Estimación lineal de la curva de análisis de cadmio

Parámetro de control	Símbolo	Valor
Pendiente	m	0,003
Desv.est. Pendiente	Sm	0,001
Coeficiente de correlación ²	R2	0,992
Algoritmo	Fisher	1672,569
t de student	t	2,178
Límite superior	Lo.sup.	0,064
Límite inferior	Lo.inf.	-0,111
Ordenada al origen	Lo	-0,024
Desv. de la ordenada	Slo	0,018
Error tipo	Sy,x	0,040
n-2	grados de libertad	12,000
lím. Detec. (abs)	L.D (Abs)	0,016
Interpolación lím. Det (µg/ml)	L.D (conc)	13,106
lím. Cuantificación (abs)	L.C (Abs)	0,064
Interpolación lím cuant (µg /ml)	L.C (conc)	28,907
Unidades de conc.	Sx,y	13,267

Anexo I: Prueba t para medias de dos muestras emparejadas de estándares de 214 µg/l antes y después de la digestión

	<i>Antes de la digestión</i>	<i>Después de la digestión</i>
Media	174,000	173,000
Varianza	22,400	33,200
Observaciones	6,000	6,000
Coef. de correlación de Pearson	0,381	
Grados de libertad	5,000	
Estadístico t	0,415	
P(T<=t) una cola	0,348	
Valor crítico de t (una cola)	2,015	
P(T<=t) dos colas	0,695	
Valor crítico de t (dos colas)	2,571	

Anexo J: Prueba t para medias de dos muestras emparejadas de soluciones de 107 µg/l antes y después de la digestión

	<i>Antes de la digestión</i>	<i>Después de la digestión</i>
Media	159,600	165,400
Varianza	76,300	50,800
Observaciones	5,000	5,000
Coef. de correlación de Pearson	0,602	
Grados de libertad	4,000	
Estadístico t	-1,795	
P(T<=t) una cola	0,074	
Valor crítico de t (una cola)	2,132	
P(T<=t) dos colas	0,147	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776	

Anexo K: Prueba t para medias de dos muestras emparejadas de muestras con biomasa antes y después de la digestión

	<i>Antes de la digestión</i>	<i>Después de la digestión</i>
Media	94,000	154,000
Varianza	852,800	9203,600
Observaciones	6,000	6,000
Coef. de correlación de Pearson	0,802	
Grados de libertad	5,000	
Estadístico t	-1,970	
P(T<=t) una cola	0,053	
Valor crítico de t (una cola)	2,015	
P(T<=t) dos colas	0,106	
Valor crítico de t (dos colas)	2,571	

Anexo L: Prueba t para medias de dos muestras emparejadas de estándares de 214 µg/l por el método de absorción atómica y ditizona

	<i>Ditizona</i>	<i>Absorción atómica</i>
Media	173,000	200,000
Varianza	33,200	3760,000
Observaciones	6,000	6,000
Coef. de correlación de Pearson	-0,074	
Grados de libertad	5,000	
Estadístico t	-1,067	
P(T<=t) una cola	0,167	
Valor crítico de t (una cola)	2,015	
P(T<=t) dos colas	0,335	
Valor crítico de t (dos colas)	2,571	

Anexo M: Prueba t para medias de dos muestras emparejadas de soluciones de 107 µg/l por el método de absorción atómica y ditizona

	Ditizona	Absorción atómica
Media	165,400	142,000
Varianza	50,800	1270,000
Observaciones	5,000	5,000
Coef. de correlación de Pearson	-0,732	
Grados de libertad	4,000	
Estadístico t	1,272	
P(T<=t) una cola	0,136	
Valor crítico de t (una cola)	2,132	
P(T<=t) dos colas	0,272	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776	

Anexo N: Prueba t para medias de dos muestras emparejadas de muestras con biomasa por el método de absorción atómica y ditizona

	Ditizona	Absorción atómica
Media	154,000	316,667
Varianza	9203,600	59026,667
Observaciones	6,000	6,000
Coef. de correlación de Pearson	0,907	
Grados de libertad	5,000	
Estadístico t	-2,473	
P(T<=t) una cola	0,028	
Valor crítico de t (una cola)	2,015	
P(T<=t) dos colas	0,056	
Valor crítico de t (dos colas)	2,571	

Anexo O: Remoción de cadmio por *S. cerevisiae*

Réplica	Abs del inóculo (600 nm)	ufc/ml (E+07)	ufc/40 ml (E+07)	Cd inicial teórico (µg/l)	Cd inicial experimental (µg/l)	Cd final (µg/l)			
						Tiempo (Horas)			
						0,16	3	6	9
1	1,367	15,81	63,24	34240	34938,89	3058,37	859,67	469,67	401,20
2	1,387	16,06	64,24	34240	30383,30	3059,81	1953,00	1777,53	1712,20
3	1,317	15,17	60,68	34240	27216,67	3832,22	2263	2129,5	2098,14

Anexo P: Remoción de cadmio por *M. pulcherrima*

Réplica	Abs del inóculo (600 nm)	ufc/ml (E+07)	ufc/40 ml (E+07)	Cd inicial teórico (µg/l)	Cd inicial experimental (µg/l)	Cd final (µg/l)			
						Tiempo (Horas)			
						0,16	3	6	9
1	1,355	15,66	62,64	34240	34938,89	24883,33	1524,17	1132,92	599,58
2	1,356	15,67	62,69	34240	30383,30	18327,78	2265,83	1239,33	508,06
3	1,363	15,76	63,04	34240	27216,67	17050,0	2915,83	2950,22	2199,2

Anexo Q: Remoción de cadmio por *L. sp.LE034*

Réplica	Abs del inóculo (600 nm)	ufc/ml (E+07)	ufc/40 ml (E+07)	Cd inicial teórico (µg/l)	Cd inicial experimental (µg/l)	Cd final (µg/l)			
						Tiempo (Horas)			
						0,16	1	2	3
1	1,314	15,14	60,55	34240	30383,33	4631,67	2046,43	2015,83	1849,17
2	1,310	15,09	60,35	34240	29050,00	3148,33	2899,17	2034,52	1574,17
3	1,332	15,37	61,47	34240	28383,33	2252,67	2008,82	1612,67	1479,33

Anexo R: ANOVA para la levadura *S. cerevisiae*

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	76,49	3	25,50	2,62	0,12	4,07
Dentro de los grupos	77,81	8	9,73			
Total	154,30	11				

Anexo S: ANOVA para la levadura *M. pulcherrima*

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	7835,19	3	2611,73	141,21	0,0000003	4,07
Dentro de los grupos	147,96	8	18,50			
Total	7983,15	11				

Anexo T: ANOVA para la levadura *L. sp.LE034*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	58,07	3	19,36	4,45	0,04	4,07
Dentro de los grupos	34,78	8	4,35			
Total	92,85	11				

Anexo U: Test de Tukey para la levadura *Metschnikowia pulcherrima*

HSD= 10,03

Tiempo (Horas)	0,16	3	6	9
0,16				
3	57,22*			
6	58,68*	1,46		
9	60,91*	3,69	2,23	

*Diferencia significativa

Anexo V: Test de Tukey para la levadura *Lecythophora sp.LE034*

HSD= 4,86

Tiempo (Horas)	0,16	1	2	3
0,16				
1	3,41			
2	4,90*	1,49		
3	5,77*	2,36	0,87	

*Diferencia significativa