

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:
INGENIERÍA AMBIENTAL

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERAS
AMBIENTALES

TEMA:
EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD BACTERIANA PARA
REMOVER CADMIO EN AGUAS RESIDUALES SINTÉTICAS.

AUTORAS:
CARMEN LUCRECIA RUBIO CAIZA
KATHERIN LISVET TERÁN MORENO

TUTOR:
LENIN JAVIER RAMÍREZ CANDO

Quito, junio del 2016

Cesión de derechos de autor

Nosotros, Carmen Lucrecia Rubio Caiza, con documento de identificación N° 1723213540 y Katherin Lisvet Terán Moreno, con documento de identificación N° 1723525455, manifiesto nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación intitulado: EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD BACTERIANA PARA REMOVER CADMIO EN AGUAS RESIDUALES SINTÉTICAS, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de Ingenieras Ambientales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....
Nombre: Carmen Lucrecia Rubio Caiza
Cédula: 1723213540

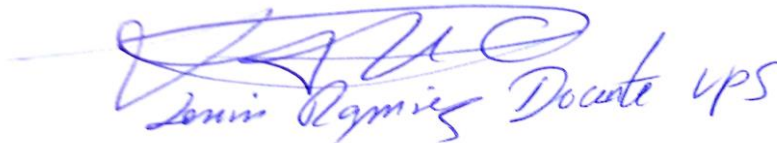


.....
Nombre: Katherin Lisvet Terán Moreno
Cédula: 1723525455
Fecha: junio del 2016

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD BACTERIANA PARA REMOVER CADMIO EN AGUAS RESIDUALES SINTÉTICAS, realizado por Carmen Lucrecia Rubio Caiza y Katherin Lisvet Terán Moreno, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, junio 2016



Lenin Javier Ramírez Cando

Cédula de identidad: 1104250426

ÍNDICE

Introducción.....	1
1. Hipótesis.....	2
1.1. Hipótesis de investigación.....	2
1.2. Hipótesis nula.....	2
1.3. Hipótesis alternativas.....	2
2. Objetivos.....	2
2.1. Objetivo general.....	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
3. Marco teórico.....	3
3.1. Metales pesados.....	3
3.2. El cadmio.....	4
3.3. Efectos del cadmio en el hombre y el medio ambiente.....	4
3.4. Bacterias.....	5
3.5. Biorremediación.....	6
3.6. Técnicas de biorremediación.....	7
3.7. Uso de bacterias en la biorremediación.....	8
3.8. Turbidimetría.....	10
3.9. Cinética de crecimiento bacteriano.....	10

3.10.	Espectrometría de absorción atómica.....	14
3.11.	Ley de Lambert-Beer.....	15
4.	Materiales.....	16
4.1.	Laboratorio	16
4.2.	Muestras de agua	16
5.	Métodos.....	17
5.1.	Bioestimulación y aislamiento de bacterias	17
5.2.	Pruebas bioquímicas.....	20
5.3.	Evaluación de la cinética de crecimiento bacteriano.....	26
5.4.	Elaboración de la curva de calibración.....	27
5.5.	Diseño experimental.....	29
5.6.	Métodos de evaluación (Estadística).....	31
6.	Resultados.....	32
6.1.	Bacterias aisladas a partir de la muestra de agua residual.....	32
6.2.	Morfología bacteriana	32
6.3.	Perfil bioquímico de las bacterias.....	33
	Discusión de resultados	56
	Conclusiones	59

Recomendaciones.....	60
Referencias	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Instrumental utilizado en el proyecto.	16
Tabla 2. Test de reducción de nitrato.	23
Tabla 3. Test después de la adición de polvo de zinc.....	23
Tabla 4. Interpretación tras 24 horas de incubación (Enterobacteriaceae).....	24
Tabla 5. Interpretación tras 48 horas (Organismos Oxidasa positivos).	25
Tabla 6. Preparación de estándares MC FARLAN	27
Tabla 7. Tratamientos definidos en la investigación.....	30
Tabla 8. Cantidad de bacterias aisladas.....	32
Tabla 9. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias.....	32
Tabla 10. Aplicación de pruebas bioquímicas mediante el Kit Microgen GnA+B -ID	33
Tabla 11. Características Microscópicas.	34
Tabla 12. Datos del crecimiento bacteriano a la concentración de 2 ppm de la cepa <i>Acinetobacter sp.</i>	38
Tabla 13. Datos del crecimiento bacteriano a la concentración de 2 ppm de la cepa <i>Pseudomona sp</i> (Morfología fenotípica 1).	42
Tabla 14. Datos del crecimiento bacteriano a la concentración de 2 ppm de la cepa <i>Pseudomona sp</i> (Morfología fenotípica 2).	46

Tabla 15. Datos del crecimiento bacteriano a la concentración de 2 ppm de la cepa <i>Aeromona hydrophila</i>	50
Tabla 16. Datos del crecimiento bacteriano a la concentración de 2 ppm de la cepa <i>Aeromona sp.</i>	54
Tabla 17. Prueba de Shapiro-Wilk aplicada a los datos de temperatura interna del cultivo a la concentración de 2 ppm.....	71
Tabla 18. Prueba de U Man-Whitney aplicada a los datos de temperatura interna del cultivo a la concentración de 2 ppm.....	71
Tabla 19. Prueba de T Student aplicada a los datos de temperatura interna del cultivo a la concentración de 2 ppm.....	71
Tabla 20. Prueba de Shapiro-Wilk aplicada a los datos de pH a una concentración de 2 ppm.....	72
Tabla 21. Prueba de U Man-Whitney aplicada a los datos de pH a una concentración de 2 ppm.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento bacteriano.	12
Figura 2. Método de placa pobre.....	18
Figura 3. Técnica de siembra por estrías en cuadrantes.....	19
Figura 4. Curva de calibración para el crecimiento bacteriano.....	28
Figura 5. Valores de absorbancia atómica del cultivo.	35
Figura 6. Curva de calibración de Cd	36
Figura 7. Crecimiento bacteriano de <i>Acinetobacter sp.</i> a la concentración de 2 ppm.	37
Figura 8. Porcentaje de remoción de Cd a la concentración de 2 ppm.	38
Figura 9. Temperatura interna del cultivo.....	39
Figura 10. pH de desarrollo.....	40
Figura 11. Crecimiento bacteriano de <i>Pseudona sp</i> (Morfología fenotípica 1) a la concentración de 2 ppm.	41
Figura 12. Porcentaje de remoción a la concentración de 2 ppm.....	42
Figura 13. Temperatura interna del cultivo.....	43
Figura 14. pH de desarrollo.....	44
Figura 15. Crecimiento bacteriano de <i>Pseudomona sp.</i> (Morfología fenotípica 2) a la concentración de 2 ppm... ..	45
Figura 16. Porcentaje de remoción a la concentración de 2 ppm.....	46
Figura 17. Temperatura interna del cultivo.....	47

Figura 18. pH de desarrollo.....	48
Figura 19. Crecimiento bacteriano de <i>Aeromona hydrophila</i> a la concentración de 2 ppm.....	49
Figura 20. Porcentaje de remoción a la concentración de 2 ppm.....	50
Figura 21. Temperatura interna del cultivo.....	51
Figura 22. pH de desarrollo.....	52
Figura 23. Crecimiento bacteriano de <i>Aeromona hydrophila</i> a la concentración de 2 ppm.....	53
Figura 24. Porcentaje de remoción a la concentración de 2 ppm.....	54
Figura 25. Temperatura interna del cultivo.....	55
Figura 26. pH de desarrollo.....	56
Figura 27. Materiales para la preparación de Agar Cetrimida.....	67
Figura 28. Tinción Gram.....	67
Figura 29. Reactivos del kit Microgen GnA+ B-ID.....	68
Figura 30. Guía de resultados del kit Microgen GnA+ B-ID.....	68
Figura 31. Resultados de las pruebas bioquímicas.....	69
Figura 32. Análisis del modelo lineal	70

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Material fotográfico	67
Anexo 2. Pruebas bioquímicas.....	68
Anexo3. Análisis del modelo lineal.....	70
Anexo 4. Estadística aplicada para los datos de temperatura interna del cultivo a la concentración de 2 ppm.....	71
Anexo 5. Estadística aplicada a los datos de pH para la concentración de 2 ppm.....	72

Resumen

La acumulación y presencia de metales pesados como el cadmio en aguas residuales causan preocupación debido a su toxicidad y a la complejidad de su eliminación. Uno de los métodos de remoción de metales es el uso de bacterias, existen especies y géneros que por sus características pueden acumular metales o transformarlos en compuestos menos tóxicos. El objetivo de esta investigación fue evaluar *in vitro* la capacidad bacteriana de remoción de cadmio en aguas residuales sintéticas. Para la investigación se procedió a sembrar las bacterias, aislarlas y realizar pruebas bioquímicas para identificarlas. Se seleccionaron cinco cepas: *Acinetobacter sp.*, *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 1), *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 2), *Aeromona hydrophila* y *Aeromona sp.*, las mismas que se cultivaron en medio líquido a la concentración de 2 ppm y 10 ppm de Cd, se evaluó la remoción del metal realizando mediciones cada dos horas de las variables temperatura, pH y turbidez a temperatura de incubación ambiente y temperatura controlada (25°C). Para determinar los resultados, se aplicó el diseño experimental por bloques completamente al azar y el análisis estadístico con la prueba de Shapiro – Wilk, U Mann Whitney y T Student. Al finalizar el experimento, la concentración de 10 ppm de cadmio inhibió el crecimiento de las cepas, pero a 2 ppm todas las bacterias lograron adaptarse al medio. *Acinetobacter sp* presentó el 77,49% de remoción de cadmio, *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 1) el 68,78% y *Aeromona hydrophila* el 66.98% a la concentración de 2 ppm.

Abstract

Accumulation and presence of heavy metals such as cadmium in wastewater cause concern because of its high toxicity and complexity of its elimination. One of the methods for metal removal is the use of bacteria; some species can accumulate metals or convert them into less toxic forms, due to their characteristics or morphology. The aim of this research was to evaluate *in vitro* the capacity of bacteria to remove cadmium in synthetic wastewater. For the experimental phase, bacteria were isolated and then biochemical tests to identify them were performed. Five species were selected: *Acinetobacter sp.*, *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 1), *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 2), *Aeromona hydrophila* and *Aeromona sp.*, which they were cultivated in liquid medium at concentrations of 2 ppm and 10 ppm of cadmium. Metal removal was evaluated each two hours by measurement of the variables temperature, pH and turbidity at room temperature and controlled temperature (25°C). Concerning data analysis, the experimental design was applied by randomized block analysis and statistical test: Shapiro-Wilk, Mann Whitney U and T Student. At the end of the experiment, the 10 ppm's concentration of cadmium inhibited the growth of all species, however, at 2 ppm the bacteria were able to adapt to the environment. *Acinetobacter sp.* presented 77.49% removal of cadmium, *Pseudomonas sp.* (Phenotypic Morphology 1) presented 68.78 % and *Aeromona hydrophila* indicated 66.98% at 2 ppm's concentration.

Introducción

Una de las principales causas de deterioro del medio ambiente lo constituye la contaminación con metales pesados, ya que representan un riesgo tanto para las personas como para el equilibrio del ecosistema, “debido al nivel de toxicidad que ellos representan para la salud humana; a su persistencia en los ecosistemas y a acumulación en los organismos, ya que se tratan de elementos que no se biodegradan fácilmente” (Carballo et al. 2012, pág. 35).

El trabajo de investigación se realizó como una alternativa para la remoción de cadmio, mediante el proceso de biorremediación con el uso de bacterias, en sustitución a procesos químicos empleados para disminuir la concentración del metal en zonas contaminadas, dado que es parte del grupo de metales pesados que contaminan el medio ambiente. Además representan un peligro para la vida acuática porque resultan ser muy tóxicos incluso en concentraciones relativamente bajas, no son biodegradables, al contrario, se acumulan a lo largo de la cadena trófica (Lima et al. 2005, pág. 116).

Esta alternativa de remoción del metal se podrá aplicar en industrias que usen cadmio en sus procesos de operación como minería, galvanizadoras, entre otras.

1. Hipótesis

1.1. Hipótesis de investigación

Las cepas aisladas reducen la concentración de Cd en aguas residuales

1.2. Hipótesis nula

Ho: Las cepas aisladas no reducen la concentración de Cd en aguas residuales

1.3. Hipótesis alternativas

H1: Las cepas aisladas reducen una parte de la concentración de Cd en aguas residuales

H2: Las cepas aisladas no remueven el Cd en aguas residuales

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Valorar in vitro la capacidad de remoción de cadmio en aguas residuales preparadas en laboratorio.

2.2. Objetivos específicos

Apartar y determinar las características morfológicas de las bacterias resistentes al cadmio procedentes de las muestras de agua residual.

Seleccionar las bacterias que desarrollen mayor tolerancia a 2 ppm y 10 ppm de Cd.

Aplicar pruebas bioquímicas de identificación para determinar las características metabólicas de las bacterias y aproximar la especie.

Evaluar in vitro la eficiencia de remoción de cadmio en agua residual sintética a temperatura de incubación ambiente y temperatura controlada (25°C).

3. Marco teórico

Los metales pesados como el cromo, níquel, cadmio, plomo y mercurio son sustancias tóxicas generadas por las actividades humanas como la industrialización y urbanización, estos se liberan en el medio ambiente, contaminando suelo, aire y agua. La contaminación puede provocar en la biota, alteraciones estructurales, morfológicas y hasta muerte celular (Argota et al., 2012, pág. 2, 3).

El cadmio “es parte de los metales pesados por lo que es un metal tóxico que causa daño a las actividades biológicas vitales produciendo efectos irreversibles en diferentes organismos”(Carballo et al., 2012, pág. 35).

3.1. Metales pesados

Según (Tejada, Villabona, & Garcés, 2015, pág. 111), los metales pesados tienden a persistir indefinidamente en el medio ambiente debido a su acumulación e ingreso a la cadena trófica, comprometiendo así el bienestar y equilibrio no sólo de la fauna y flora del ecosistema, aunque algunos de estos elementos son indispensables para el desarrollo de la vida, en altas concentraciones pueden provocar daños severos en la salud de las personas.

La característica más importante de los metales pesados es que tienden a bioacumularse y biomagnificarse, en este proceso muchas toxinas

alcanzan concentraciones perjudiciales en las células de los seres vivos como consecuencia del recorrido por los diversos eslabones de las cadenas tróficas (Tirado, González, Martínez, Wilches, & Celedón, 2015, pág. 86).

3.2. El cadmio

El cadmio es un elemento que se encuentra en forma natural en la corteza terrestre, regularmente formando parte de las menas de zinc, plomo y cobre, este metal puede viajar largas distancias a través de la atmósfera para luego depositarse sobre suelo y agua (Díaz, 2014. pág. 14, 18). Se aplica en diversas actividades dentro de la industria como la galvanoplastia, galvanización, pigmentos para crear tintes, pinturas, cerámica de color amarillo brillante, en baterías de níquel, como estabilizador en plásticos, fotoceldas, componentes electrónicos, radiadores para automóviles y elementos de calefactores (Pérez & Azcona, 2012, pág. 200).

Adicionalmente, “participa en procesos como la fabricación de níquel-cadmio, la incineración de combustibles fósiles y fertilizantes fosfatos” (Martínez, Souza, Bucio et al., 2013, pág. 33). Así como también en “la incineración de residuos de madera, carbón o plásticos, la combustión de aceite y gasolina” (Ramírez, 2002, pág. 52).

3.3. Efectos del cadmio en el hombre y el medio ambiente

Este metal es capaz de combinarse con otros elementos y formar compuestos como cloruros, óxidos y sulfuros, de esta manera se incorpora

a las partículas del suelo, por lo que llega fácilmente a las plantas y por ende afecta a los seres humanos (Martínez et al., 2013, pág. 33). Se moviliza a través del suelo dependiendo de los factores del pH y el contenido de materia orgánica, a este último se adhiere fuertemente hasta entrar en contacto con la superficie radial de las plantas a través de una difusión de iones (Acosta & Montilla, 2011, pág.24).

El ser humano está expuesto a este metal a través del agua e ingesta de comida contaminada por cadmio (hojas de vegetales, granos, cereales, frutas viseras de animales y pescado). Así como también por la inhalación de partículas de cadmio por aquellas personas que trabajan en industrias que usan este tipo de metal (Nava & Méndez, 2011, pág. 141). En personas que han estado expuestas a un exceso de cadmio debido a su dieta o por el aire contaminado, han padecido daño en los riñones, mientras que en trabajadores de fábricas, en donde el nivel de concentración de cadmio en el aire es alto, han sufrido daños en los pulmones originando, incluso, enfisemas (Gutiérrez, 2015, pág. 7).

3.4. Bacterias

Las bacterias son “estructuras unicelulares, se reproducen por medio de un proceso asexual denominado fusión binaria, en su estructura presentan componentes externos que son la membrana citoplasmática, pared celular y citoplasma con todos sus componente” (Lucana & Huanca, 2014. pág. 2589).

En virtud de la capacidad de desarrollarse en diversos hábitats, las bacterias han sido objeto de cuantiosas investigaciones debido a su

aportación en los ciclos biogeoquímicos y por su capacidad para convertir compuestos no esenciales, que eventualmente pueden constituir una amenaza para el ambiente. A nivel extracelular se ejecutan las interacciones entre bacterias y los metales, pues actúan en la movilización e inmovilización de metales (Suárez & Reyes, 2002, pág. 160).

3.4.1. Aplicación de las bacterias

Las bacterias tienen diversas aplicaciones, por ejemplo en el campo alimenticio se usan bacterias lácticas para la fermentación de alimentos como leche, carne y vegetales para obtener productos como yogurt, quesos, embutidos, etc. Asimismo, en la producción de vinos y cerveza (Ramírez, Ulloa, Velázquez, Ulloa, & Arce, 2011, pág. 1).

También se usan en tratamientos biológicos para depurar aguas residuales y recuperar suelos contaminados. En la agricultura las bacterias se usan como “insecticida biológico para controlar numerosos insectos impidiendo plagas que afectan la agricultura y la actividad forestal”(Carreras, 2011, pág. 129).

3.5. Biorremediación

Es un proceso en el que se aplican bacterias o enzimas producidas por éstos, para ser utilizados en la transformación o minimización de concentraciones tóxicos, por ejemplo, de metales pesados, insecticidas o hidrocarburos en distintos hábitats como ríos, lagos, suelo y mar (Gutiérrez, 2015, pág. 15; Vargas, Cuéllar, & Dussán, 2004, pág. 45).

Para aplicar la biorremediación en un área contaminada, se introduce una cepa o población microbiana que disponga de mecanismos esenciales para metabolizar el contaminante. Para que una cepa insertada en un ambiente nuevo se desarrolle necesita de componentes como la variación de temperatura, el pH, las reacciones de oxidación y reducción, sustancias esenciales para su crecimiento. (Alí & Lozada, 2011, pág. 229).

3.6. Técnicas de biorremediación

Biorremediación intrínseca o bioatenuación natural: “está basada en la capacidad de las poblaciones microbianas autóctonas para llevar a cabo, de forma natural y simultánea a otros procesos físicos-químicos, como la volatilización, una eliminación de los contaminantes” (Vila et al., 2014, pág. 49).

Bioestimulación: es una técnica en la que “se adiciona nutrientes, principalmente fuentes de nitrógeno y fosforo, para favorecer el crecimiento y desarrollo microbiano, al igual que la estimulación por medio de la adición de agua, oxígeno y otros elementos que mejoren el crecimiento de los microorganismos” (Ñútez, Paredes, & Cubillos, 2014, pág. 21).

Bioaumentación: consiste en “la adición de microorganismos endógenos o exógenos a un lugar específico con el fin de fomentar la degradación y disminuir el tiempo de reducción del contaminante” (Ñútez et al., 2014, pág. 21).

Fitorremediación: se aplica mediante el uso de plantas para la operación de limpieza ambiental, ya que algunas de ellas han desarrollado la capacidad de tomar y acumular metales en sus tallos, en niveles que

resultan tóxicos para otras especies. Además las plantas han desarrollado interacciones y asociaciones en las raíces, con organismos que pueden degradar o transformar en forma acelerada ciertos contaminantes, a productos que no representan amenazas ambientales (Alí & Lozada, 2011, pág. 229).

Biom mineralización: esta técnica tiene un proceso en el cual los organismos producen minerales como resultado de su actividad celular, la cual provoca, por un lado, los cambios fisicoquímicos necesarios para que se produzca la nucleación y el posterior crecimiento de los núcleos formados (Castro, 2012, pág. 151).

Biorremediación “in situ”: “consiste en tratar el material contaminado en el lugar en que se encuentra sin trasladarlo a otra parte” (Barrios, 2011, pág. 62). Se puede acelerar el proceso modificando las condiciones ambientales o por inoculación microbiana.

Biorremediación “ex situ”: “implica la excavación y traslado de los suelos contaminados; y en el caso de las aguas significa el bombeo-tratamiento-recarga o traslado a reactores” (Barrios, 2011, pág. 62).

3.7. Uso de bacterias en la biorremediación

Las bacterias desempeñan un papel importante en la biotecnología ya que ayuda a la recuperación de suelos o aguas contaminadas por sustancias tóxicas.

Souza (2007), menciona que los géneros más utilizados en la degradación de contaminantes son *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alicalicogenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Micrococuss*, *Vibrio*. La mayor parte de estudios se han llevado a cabo

con cepas bacterianas individuales o en la combinación de diferentes cepas aisladas (Gavilánez, 2013, pág. 11).

Como ejemplos de las bacterias que se usan en la biorremediación tenemos:

Pseudomonas: estas bacterias tienen la capacidad de degradar compuestos tóxicos como por ejemplo hidrocarburos, la eficacia de la degradación de contaminantes depende de factores como el lapso de interacción con la sustancia tóxica, del entorno en que se desarrolle y su adaptabilidad (Escorza, 2007, pág. 46).

Las pseudomonas “juegan un papel importante en varios procesos como en la degradación de alcanos, oxidación de tolueno, degradación de la atrazina, en el control biológico de plantas” (Alanís & Guerrero, 2004, pág. 26).

Pseudomona aeruginosa: esta bacteria tiene la capacidad de crecer hasta una temperatura de 42°C, utiliza una gran variedad de compuestos orgánicos como sustratos para su crecimiento, puede ser aislada de una gran variedad de ambientes acuáticos como terrestres, por lo que es considerada ubicua (Guevara, 2010, párr. 3,4).

Este género “ha sido destacado en diversos procesos de degradación y a menudo se encuentra en medios contaminados con derivados de petróleo” (Echeverri, Manjarrez, & Cabrera, 2011, pág. 84).

Acinetobacter: el género ha sido aplicado en “la biorremediación de hidrocarburos aromáticos, así como en la producción de heteropolisacáridos de alto peso molecular que actúan como emulsionantes de gran alcance” (Echeverri et al., 2011, pág. 84).

3.8. Turbidimetría

La turbidimetría calcula el porcentaje de absorción de la luz para estimar el número de células; en otras palabras, el crecimiento celular. La turbidez del cultivo bacteriano se correlaciona con propiedades medible, como el número de células, analizando por recuento de bacterias viables (Riverón et al., 2012, pág. 1).

Para evaluar la turbidez se emplea el turbidímetro, el cual calcula la absorbancia de la muestra en estudio. La técnica empleada se basa en el uso de un inóculo de microorganismos en medio líquido, que interviene como una suspensión coloidal, la misma que bloquea la luz que pasa a través de él. La luz es absorbida de forma directamente proporcional a la concentración de células que existe en el cultivo (Acebo & Hernández, 2013, párr.7).

3.9. Cinética de crecimiento bacteriano

La crecimiento de la población bacteriana se analiza mediante expresiones dinámicas de la vida microbiana, por ejemplo: el crecimiento, la supervivencia, la muerte, la adaptaciones, la mutaciones, la formación de productos, los ciclos celulares e interacciones con el medio ambiente y con otros organismos (Varela & Grotiuz, 2002, pág. 43).

Según (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2009), la velocidad de crecimiento de las bacterias es constante; o sea, que se dividen y su número se duplica a intervalos regulares. Así mismo, el número de

individuos de la población se duplicará en un cierto intervalo de tiempo, designado tiempo de generación y se enuncia mediante las ecuaciones (1), (2), (3), (4), (5), (6) (pág. 123).

$$N_t = (N_0)(2)^n \quad (1)$$

Donde:

N_0 = Número inicial de células (población inicial)

N_t = Número de células en el tiempo t

n = Número de generación en el tiempo t

Usando logaritmos de base decimal, se puede obtener n , (Nº de generación)

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N_t - \log N_0}{0,301} \quad (2)$$

Luego se determina la constante de velocidad media de crecimiento (k):

$$k = \frac{n}{t} = \frac{\log N_t - \log N_0}{0,301t} \quad (3)$$

Si la población se duplica ($t=g$), entonces:

$$N_t = 2N_0 \quad (4)$$

Sustituyendo $2N_0$ en la ecuación de la velocidad media de crecimiento y despejando k ,

tendremos:

$$k = \frac{\log(2N_0) - \log N_0}{0,301g} = \frac{\log 2 + \log N_0 - \log N_0}{0,301g} = \frac{1}{g} \quad (5)$$

$$g = \frac{1}{k} \quad (6)$$

3.9.1. Medio de cultivo líquido

“Cuando se cultivan bacterias en medio líquido, se realizan en un cultivo discontinuo o sistema cerrado, estas bacterias son incubadas en un recipiente cerrado al que no se aumenta más cantidad de medio que la inicial” (Willey et al., 2009, pág.123).

El crecimiento de una bacteria consta de cuatro fases que son:

Fase de latencia: “en esta fase se requiere introducir bacterias en un medio de cultivo fresco con las condiciones necesarias para que se adapten al mismo, generalmente no se produce un aumento inmediato del número de células” (Willey et al., 2009, pág. 123).

Fase exponencial o logarítmica: “esta fase consiste en el crecimiento de las bacterias, las misma que se dividen a una velocidad máxima posible para llevar a su potencial genético mediante la naturaleza del medio y las condiciones del cultivo” (Willey et al., 2009, pág. 123).

Curva de crecimiento bacteriano



Figura 1. Muestra las cuatro fases típicas de crecimiento y desarrollo de la bacteria. Fuente: (Totor, Funke, & Case, 2007).

Fase estacionaria: esta fase ocurre cuando el crecimiento de la población se detiene. La población bacteriana entra a la fase estacionaria debido a la limitación de nutrientes, la disponibilidad de oxígeno en el caso de microorganismos aerobios, la acumulación de productos residuales tóxicos (Willey et al., 2009, pág. 124).

Fase de muerte: esta fase depende de los cambios ambientales perjudiciales como la privación de nutrientes y la depósito de desechos tóxicos, estos factores pueden causar daños irreparables, causando la disminución del número de células viables; por lo que las células morían sin sufrir lisis (Willey et al., 2009, pág. 124).

3.9.2. Medio de cultivo sólido

Un medio sólido se puede elaborar en base a cultivos líquidos, agregando diversas sustancias solidificantes por ejemplo el agar cetrimida o la gelatina. Estos medios se aplican con frecuencia en el aislamiento y subsistencia de las bacterias en los laboratorios (Santambrosio, Ortega, & Garibaldi, 2009, párr. 6).

El desarrollo de colonias en la superficie de los medios con agar sirve para identificar las bacterias, pues cada especie suele formar colonias de tamaño y características diferentes. Las bacterias que se desarrollen en superficies sólidas pueden generar formas coloniales intrincadas y muy complicadas. Estos varían según la reserva de nutrientes y de la dureza de la superficie del medio (Willey et al., 2009, pág. 117).

3.10. Espectrometría de absorción atómica

Es una técnica muy sencilla que se emplea para establecer elementos metálicos y metaloides, es de costo relativamente baja, para aplicar a una gran diversidad de muestras y específica debido a que las líneas de absorción atómica son ampliamente estrechas (de 0,002 a 0,005 nm) y la energía de transición electrónica son únicas para cada elemento (Gallegos, Vega, & Noriega, 2012, pág. 19).

La espectrometría de absorción atómica “es un método susceptible para determinar cuantitativamente un aproximado de sesenta metales o más” (Skoog, Holler, & Nieman, 2001, pág. 239).

El procedimiento de la espectroscopia de absorción atómica (E.A.A.) es el siguiente:

La muestra en forma líquida es aspirada por medio de un tubo capilar, para luego ser transportada a un nebulizador, en donde se disgrega la muestra y produce una condensación del líquido. El rocío generado es transportado a una llama, donde se producen una variedad de procesos para formar átomos, los cuales atraen la radiación constituida por la lámpara. La señal emitida por la lámpara cruza entre la llama, se incorpora a un monocromador, con la finalidad el disminuir completamente las señales unidas a la línea de importancia. La señal de radiación electromagnética, entra a un detector y se conduce a un amplificador para llegar al sistema de lectura (Remache, 2013, pág.26).

3.11. Ley de Lambert-Beer

La ley de Lambert-Beer se refiere a que “la intensidad de luz transmitida por un cuerpo es igual a la intensidad de luz que incurre en una variable” (Marca, Canales, Tobal, & Escudero, 2011, pág. 24).

Cuando un haz de radiación monocromática de una establecida longitud de onda, traspasa una capa de disolución que sujeta una especie absorbente, la intensidad del haz incidente I_0 , se atenúa, reduciendo hasta una intensidad I . La transmitancia (T) se concreta como la fracción de radiación incidente que logra atravesar la muestra. Para una capa de disolución absorbente de espesor infinitamente pequeño (db), la disminución de la intensidad (dI), viene dada por:

$$\frac{dI}{I} = -kCdb \quad (7)$$

Integrando y reagrupando las ecuaciones (7), (8), (9), (10) se obtiene (11) (Remache, 2013, pág. 24,25)

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = - \int_0^{db} kCdb \quad (8)$$

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -kCb = 2.3 \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (9)$$

$$\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\log T = A \quad (10)$$

$$A = \epsilon bC \quad (11)$$

4. Materiales

4.1. Laboratorio

La Tabla 1 indica el instrumental empleados en la investigación.

Tabla 1.

Instrumental utilizado en el proyecto

Materiales	Equipos	Reactivos
Vasos de precipitación de 500, 250 y 100 mL	Microscopio: MC-50	Agar Cetrimida
Balón volumétrico de 500 mL	Cámara de flujo laminar: SCR-2	Cristal violeta
Matraz aforado de 500 mL	A2	Lugol
Pipetas graduadas de 100-1000 µl y 50-500 µl	Incubadora: 107905	Alcohol cetona
Pipeta Pasteur	pH metro digital: Mettler	Safranina
Probetas	Toledo	Estándar de Plomo
Asas de siembra	Balanza analítica: CQT202	Estándar de Cadmio
Cajas Petri	Plancha de calentamiento: HSC	Estándar de Arsénico
Varillas acodadas o espátulas	Cámara fotográfica	Estándar de Cromo
Drigalsky	Autoclave: NB 1080	Aceite de inmersión
Papel aluminio	Equipo de Absorción Atómica:	Alcohol
Parafilm	Varian	Agua destilada
	Turbidimetro: Lovibond-	PCB
	Turbicheck	Cloruro de Bario
		Ácido Sulfúrico

Nota: C. Rubio y K. Terán

4.2. Muestras de agua

Las muestras de agua residual fueron proporcionadas por el Master Lenin Ramírez y la Ingeniera María Fernanda Guevara, las cuales provienen de una empresa minera de la provincia del Oro y de la refinería Esmeraldas. Estas muestras provienen de las lagunas de oxidación y sedimentación tomadas en puntos estacionarios o de bajo flujo de caudal.

5. Métodos

5.1. Bioestimulación y aislamiento de bacterias

5.1.1. Siembra de muestras en agar Cetrimida

Para la preparación del medio líquido se utilizó: 33.975 g de Agar Cetrimida, aforándolo a 750 mL de agua destilada y 2 mL de Cd. (Ver Anexo 1, Figura 27). Se calentó moderadamente las mezclas con temperaturas de 70-80°C, agitándola constantemente hasta hervir por 1 minuto. Se esterilizó a 121°C por 15 min. Se procedió a colocar aproximadamente 20 mL del agar en cada una de las cajas Petri y se realizó la siembra de la muestra aplicando el método de caja pobre.

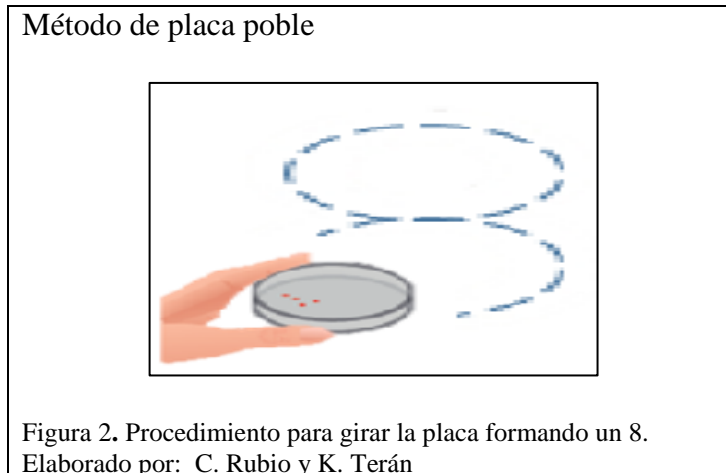
5.1.2. Método de placa pobre

El procedimiento realizó según (Aldás, 2004) cuya técnica es la siguiente:

1. Preparar las diluciones de los homogenizadores y esterilizar todo el material.
2. Marcar las cajas Petri estériles, con la fecha, número de muestra y dilución correspondiente.
3. A partir de la homogenizado preparar diluciones sucesivas de orden 10.
4. Conforme se prepara las diluciones ir pipeteando por duplicado en placas Petri estériles, alícuotas de 1 mL de las diluciones escogidas para la siembra.
5. Verter inmediatamente en las cajas Petri, 10 a 15 mL del medio de cultivo fundido y a 45°C.
6. Mezclar el inóculo con el medio fundido, con movimientos de vaivén mover las placas 5 veces en una dirección, luego repetir 5 veces el movimiento en dirección

que formen un ángulo con la primera, girar 5 veces en sentido de las agujas de reloj y 5 en sentido opuesto.

7. Girar la placa 10 veces formando un 8, como se ve en la Figura 2.



8. Se debe adoptar un sistema uniforme para todos los recuentos
9. Para prueba de esterilidad, marcar una placa con control y adicionar 15 mL de medio de cultivo y 1 mL de diluyente sin inocular.
10. Dejar reposar las placas en la mesa del laboratorio hasta la solidificación total del medio (15min).
11. Luego de solidificado el agar, invertir las placas e incubarlas a $30^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ}$ durante 48 horas \pm 3 horas.
12. Finalizando el periodo de incubación, contar todas las unidades formadas de colonias (UFC) en las placas elegidas para el recuento, si es posible las placas que tengan entre 30 a 300 colonias (pág. 71, 72).

5.1.3. Aislamiento de bacterias a partir de colonias obtenidas

Agotamiento por Estrías

“Se trata de un proceso de dilución, que da lugar a colonias aisladas para conseguir un cultivo puro, a partir del cual se podrá caracterizar una especie individual” (Willey et al., 2009, pág. 113).

Procedimiento:

1. Dividir la caja Petri en cuadrantes.
2. Esterilizar el asa en el mechero, dejar enfriar y tomar una pequeña parte de la muestra de la colonia.
3. Realizar el rayado en la superficie del agar de cada uno de los cuadrantes en sentido horario como se muestra en la Figura 3.
4. Incubar el medio de cultivo a una temperatura controlada de 25° C.

Técnica de siembra por estrías en cuadrantes



Figura 3. Indica el procedimiento de siembra en el medio de cultivo.
Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

Tinción Gram

Se realizó Tinción Gram a cada una de las muestras para caracterizarlas como Gram positivas o Gram negativas en base a las propiedades químicas y físicas de sus paredes celulares.

Procedimiento:

1. Esterilizar el portaobjetos para colocar una gota de agua destilada y una capa delgada de la muestra del cultivo realizado anteriormente.
2. Fijar la muestra por calor pasando el portaobjetos varias veces por el mechero y dejar secar la muestra al ambiente.
3. Una vez seca la muestra, colocar una gota de tinte cristal violeta hasta empapar la muestra durante un minuto, enjuagar con agua destilada.
4. Cubrir la muestra con lugol durante un minuto y aclarar con agua destilada.
5. Adicionar alcohol acetona y finalmente safranina durante 30 segundos, enjuagar con agua destilada y dejar secar el portaobjetos para proceder a examinarlo en el microscopio. (Ver Anexo 1, Figura 28).

5.2. Pruebas bioquímicas

5.2.1. Prueba de oxidasa

1. Colocar 4 gotas de solución salina en la tira de papel.
2. Coger con el aza una muestra de colonia de la caja Petri y colocar en la tira de papel.
3. Observar si en la tira de papel ocurre algún cambio de color (máximo en 30 segundos); ya que si cambia de color es oxidasa positiva y si no cambia de color es oxidasa negativa.

5.2.2. *Identificación bioquímica*

De acuerdo al manual de MICROGEN GnA+B se realizó el siguiente procedimiento:

1. Realizar un test oxidasa de la bacteria aislada. Las bacterias oxidasa positivos solamente se identifican inoculando tanto las tiras del GN A como GN B.
2. Emulsificar una única colonia conseguida de un cultivo en un intervalo de 18-24 horas en 3 mL de solución salina estéril 0.85% para la tira GN A. Si se van a inocular ambas tiras, GN A y GN B, la colonia se debe emulsificar en 3-5mL de solución salina estéril 0.85%. Mezclar bien.
3. Retirar la lámina adhesiva que sella los pocillos cuidadosamente. NO tirar la tira adhesiva, que a posteriori se volverá a necesitar.
4. Utilizando una pipeta pasteur estéril, añadir 3-4 gotas (aproximadamente 100 µL) de la suspensión bacteriana a cada pocillo de la tira(s).
5. Para verificar la pureza del inóculo, trasladar 1 gota de la suspensión bacteriana a una placa de medio no-selectivo. Incubar la placa aeróbicamente a 35-37°C durante 18-24 horas.
6. Después de la inoculación, revestir los pocillos 1,2 y 3 (numerar la tira GN A empezando por el final de la etiqueta) y pocillos 20 y 24 (tira GN B – el pocillo 13 es al final de la etiqueta) con 3-4 gotas de aceite mineral. (NO añadir aceite en el pocillo 20 si el organismo

aislado es oxidasa positiva). Estos pocillos están marcados con un círculo Negro alrededor para facilitar su identificación.

7. Sellar la parte superior de la tira(s) con la cinta adhesiva que se había retirado antes e incubar a 35-37°C. Asegurarse que los “agujeros” de la cinta adhesiva están sobre los pocillos 7, 11 y 12 en la tira GN A strip y sobre el pocillo 14 en la tira GN B.
8. Las tiras GN A y GN B se leerán después de 18-24 horas de incubación para las Enterobacteriaceae, (Ver Anexo 2) y tras 48 horas para las aisladas oxidasas positivos (“Microgen TM GnA + B-ID System,” 2007).

5.2.3. Lectura y adición de reactivos

- **Tira GNA**

1. Quitar la cinta adhesiva y anotar todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color (incluida). Anotar los resultados en la hoja de resultados proporcionada.
2. Añadir los reactivos apropiados a los siguientes micro pocillos (Ver Anexo 2):
3. Añadir 2 gotas de reactivo de Kovac al pocillo 8. Leer y anotar los resultados después de 60 segundos. Formación de color rojo indica un resultado positivo.
4. Añadir 1 gota del reactivo VP I y 1 gota del reactivo VP II al pocillo 10 y leer y anotar los resultados tras 15-30 minutos. La formación de un color rosa / rojo indica un resultado positivo.

5. Añadir 1 gota del reactivo TDA al pocillo 12 y leer después de 60 segundos. La formación de un color rojo cereza indica un resultado positivo.
6. Hacer el test de reducción de nitrato al pocillo 7 después de leer y anotar el resultado del test ONPG. Añadir 1 gota del reactivo Nitrato A y una gota del reactivo Nitrato B al pocillo y leer después de 60 segundos. El desarrollo de color rojo indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito. Si el pocillo 7 se mantiene amarillo o incoloro después de la adición de los reactivos nitratos, añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc. Esto indicará si el nitrato ha sido completamente reducido a nitrógeno gas.

Ej. Después de la adición del Nitrato A + B:

Tabla 2.

Test de reducción de nitrato

COLOR	Positivo o Negativo
Rojo	Positivo
Incoloro / amarillo	Positivo

Nota: C. Rubio y K. Terán

Tabla 3.

Test después de la adición de polvo de zinc

COLOR	Positivo o Negativo
Incoloro / amarillo	Positivo
Rojo	Negativo

Nota: C. Rubio y K. Terán

7. Anotar estos resultados adicionales en la hoja de resultados proporcionada (“Microgen TM GnA + B-ID System,” 2007).

- **Tira GNB**

1. Quitar la cinta adhesiva y anotar todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color. Anotar los resultados en la hoja de resultados proporcionada.

2. Leer los pocillos específicos según se indica:

a) El pocillo de gelatina (13) se debe leer tras 18-24 horas para Enterobacteriaceae y tras 48 horas para los aislados oxidasa positivos. Si se observan partículas negras a través del pocillo es indicativo de un resultado positivo de licuefacción de la gelatina.

b) El pocillo de la arginina se interpreta diferente tras 24 y 48 horas de incubación: 24 horas (Enterobacteriaceae) (“Microgen TM GnA + B-ID System,” 2007).

Tabla 4.

Interpretación tras 24 horas de incubación (Enterobacteriaceae)

COLOR	Positivo o Negativo
Amarillo	Negativo
Verde/Azul	Positivo

Nota: C. Rubio y K. Terán

Tabla 5.

Interpretación tras 48 horas (Organismos Oxidasa positivos)

COLOR	Positivo o Negativo
Amarillo / Verde	Negativo
Azul	Positivo

Nota: C. Rubio y K. Terán

5.2.4. Identificación del organismo aislado

En la hoja de resultados de Microgen GN-ID A+B (Ver Anexo 2), los substratos se han organizado en tripletes (sets de 3 reacciones) y se ha asignado un valor numérico a cada substrato (1, 2 o 4). La suma de las reacciones positivas para cada triplete da lugar a un único dígito, el Perfil numérico, que se utilizará para determinar la identidad del organismo aislado. El Perfil numérico se introduce en el Software Microgen Identificación System (MID-60), que genera un informe de los cinco microorganismos más parecidos en una base de datos selectiva. El software proporciona una identificación basada en probabilidad, en % de probabilidad y en el parecido con un análisis de la calidad de la diferenciación. La definición completa de estos términos y la explicación de su utilidad e interpretación la encontrará en el manual de ayuda proporcionado con el software.

Nota: Para organismos oxidasa positivos (miscelánea de bacilos Gram. negativos):

Considerar las reacciones débiles como negativos

Los resultados para la oxidasa, la reducción de nitrato y la movilidad se deben incluir para dar lugar a un Perfil numérico de 9 dígitos (“Microgen TM GnA + B-ID System,” 2007).

5.3. Evaluación de la cinética de crecimiento bacteriano

5.3.1. Factores ambientales e inóculo (Variables)

Se tomó como factor dependiente la variación en la concentración de Cd en el medio de cultivo, que fue medido de forma directa a través de absorción atómica de llama y como factores independientes: i) la concentración de microorganismos (determinado indirectamente a través de la turbidez); ii) la temperatura interna y; iii) el pH del medio. El inóculo se lo preparó con las bacterias que fueron aisladas de las muestras de agua residual, para el experimento se escogieron las cepas que se adaptaron a la concentración de 2 ppm.

5.3.2. Preparación del medio de cultivo

En la preparación del medio líquido “se pesó 4 g de extracto de levadura, 5 g de $C_{12}H_{22}O_{11}$ (sacarosa), 1 g de Na_2SO_4 , los cuales se mezclaron con un 1L de agua destilada” (Ramirez, 2012, pág. 36). Esta combinación fue la base de las dos concentraciones. Para la primera concentración, se agregó a la mezcla anterior, 1,5 mL de estándar de Cd de 1000 ppm equivalente a 2 ppm de Cd. Para la segunda concentración se añadió 20 mL de estándar Cd de 1000 ppm equivalente a 10 ppm de Cd. Se procedió a dispensar 300 mL del medio de cultivo en cada uno de los matraces, para luego esterilizar en la autoclave.

5.4. Elaboración de la curva de calibración.

Primero se prepararon los estándares según la escala Mc Farlan (se tomaron 5 puntos: 2 extremos y 3 intermedios) como se describe en la Tabla 6, utilizando agua destilada como blanco del experimento.

Tabla 6.

Preparación de estándares MC FARLAN

NÚMERO DE TUBO	PREPARACIÓN		
	H ₂ SO ₄ (1%)	BaCl ₂ (1%)	EQUIVALENCIA EN (UFC/mL)
1	9,9 ml	0,1 ml	3x10 ⁸
2	9,8 ml	0,2 ml	6x10 ⁸
3	9,7 ml	0,3 ml	9x10 ⁸
4	9,5 ml	0,5 ml	1,2x10 ⁹
5	9,4 ml	0,6 ml	1,5x10 ⁹

Nota: C. Rubio y K. Terán

A continuación, se realizó la lectura por triplicado de cada uno de los tubos en el nefelómetro ajustándolo a 625 nm. Con los datos obtenidos se elaboró la curva de calibración para el crecimiento bacteriano como se indica en la Figura 4.

Curva de calibración para el crecimiento bacteriano

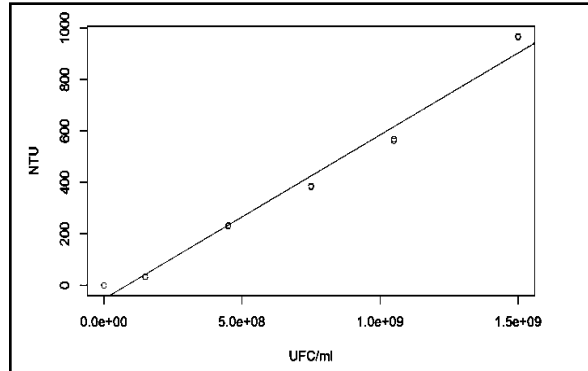


Figura 4. En el eje vertical se encuentran los valores de la turbidez (NTU) y en el eje horizontal están los valores de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL).
Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

La Figura 4 muestra la correlación entre el estándar McFarland (concentración aproximada de UFC/mL) y la turbidez. A partir de la misma, se obtuvo la ecuación (12) que representa la concentración de bacterias. En el Anexo 3 se observa el análisis estadístico del modelo regresional.

$$Y = 6.372 \times 10^{-7}(X) - 5.055 \quad (12)$$

En donde:

Y = Turbidez medida con el equipo (NTU)

X = Concentración de bacterias presentes (UFC/mL)

Mediante esta ecuación se realizó la transformación de los datos de turbidez a UFC/mL de cada cepa, ya que la turbidez (NTU) depende de UFC/mL, como se observa en la ecuación (13):

$$X = \frac{Y+5.055}{6.372 \times 10^{-7}} \quad (13)$$

5.4.1. Determinación de la curva de crecimiento bacteriano

Se inoculó las colonias en los matraces con 300 mL del medio de cultivo, agitando suavemente para obtener una mezcla homogénea, posteriormente se incubaron las muestras a 25°C y a condiciones ambientales.

Después de 4 horas se realizó la primera medición de cada matraz, para la cual se agitó el matraz para homogenizar el cultivo, a continuación, se tomó una parte del cultivo y se procedió a medir en el turbidímetro regulado a 860 nm.

Posteriormente se valoró la absorbancia del inóculo cada 2 horas para conseguir datos constantes de absorbancia como se muestra en la Figura 5, que se encuentra en la sección de Resultados.

5.5. Diseño experimental

Se empleó el diseño experimental por bloques completamente al azar, en el que se realizó el experimento por duplicado con cada tratamiento, es decir, a concentraciones de 2 ppm y 10 ppm. Se escogieron 5 cepas microbianas y se midió el pH, la temperatura interna del cultivo y la turbidez en cada uno de los tratamientos. Con los resultados obtenidos se realizó el análisis estadístico.

5.5.1. Población

La población considerada fueron los consorcios y las bacterias aisladas como se aprecia en la Tabla 8.

5.5.2. Muestra

La muestra son las 5 cepas seleccionadas: *Acinetobacter sp*, *Pseudomona sp* (Morfología fenotípica 1), *Pseudomona sp* (Morfología fenotípica 2), *Aeromona sp*,

Aeromona hydrophila., que resistieron al menos a la concentración 2 ppm de Cd en medio líquido.

5.5.3. Tratamientos

Los tratamientos establecidos fueron 2, aplicados mediante 2 bloques, tal y como se indica en la Tabla 7. El Bloque 1 se refiere a la incubación a temperatura ambiente que pertenece a la temperatura del sur de Quito, la misma que se encontró entre los 6 a 24 °C, presentando una temperatura media de 14°C. El Bloque 2 se refiere a la incubación a temperatura controlada que fue de 25°C. El valor de incertidumbre de la incubadora se encontró entre $\pm 2^\circ\text{C}$.

Tabla 7.

Tratamientos definidos en la investigación

Metal	Bacterias	Bloques	Tratamientos	Variables			
				Dependiente	Independiente	Intervinientes	
CADMIO	<i>Acinetobacter sp</i> , <i>Pseudomonas sp</i> (Morfología fenotípica 1), <i>Pseudomonas sp</i> (Morfología fenotípica 2), <i>Aeromona sp</i> , <i>Aeromona hydrophila</i>	Bloque 1	Temperatura Ambiente	T1 (2 ppm) T2 (10 ppm)	Variación en la concentración de Cd	Turbidez como medida indirecta de la concentración (UFC/mL)	Temperatura interna pH
	<i>Acinetobacter sp</i> , <i>Pseudomonas sp</i> (Morfología fenotípica 1), <i>Pseudomonas sp</i> (Morfología fenotípica 2), <i>Aeromona sp</i> , <i>Aeromona hydrophila</i>	Bloque 2	Temperatura Controlada	T1 (2 ppm) T2 (10 ppm)	Variación en la concentración de Cd	Turbidez como medida indirecta de la concentración (UFC/mL)	Temperatura interna pH

Nota: C. Rubio y K. Terán

5.5.4. Variables

En el experimento se aplicaron dos tratamientos (T1 y T2), que se refieren a las dos concentraciones de Cd a las que fueron expuestas las cepas. T1 corresponde a la concentración de 2 ppm y T2 a la concentración de 10 ppm.

Las variables intervinientes e independiente se midieron durante 6 horas al día en intervalos de 120 minutos, repitiendo el procedimiento durante 4 días a la semana.

- **pH:** para la medición del pH se utilizó el pH metro digital MettlerToledo, introduciéndolo directamente en el medio de cultivo previamente agitada.
- **Temperatura interna:** se tomó la temperatura con el termómetro, introduciéndolo en el medio de cultivo que había sido agitada previamente.
- **Turbidez:** se agitó el matraz y se tomó aproximadamente 12 mL de medio de cultivo para después medir en el turbidímetro Lovibond-Turbicheck, para posteriormente tomar los datos.

5.6. Métodos de evaluación (Estadística)

Los datos fueron procesados con la aplicación de Microsoft Excel, software R-Studio y el paquete LearnBayes.

Para determinar estadísticamente si los datos de la temperatura interna del cultivo y el pH a concentraciones de 2 ppm y 10 ppm de Cd tienen una distribución normal se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk (Anexo 3), si la distribución de los datos era normal se aplicó la prueba de T Student para comparar la diferencia de los promedios y si los datos no provienen de una distribución normal se aplicó la U Mann Whitney para confirmar si hay diferencias entre los valores de las medias. (Ver Anexo 4 y 5).

6. Resultados

6.1. Bacterias aisladas a partir de la muestra de agua residual

Tabla 8.

Cantidad de bacterias aisladas

MICROORGANISMOS	TOTAL	RESISTENTES	SENSIBLES	TOLERANCIA	SENSIBILIDAD
Bacterias aisladas	6	5	1	83,3%	16,7%
Consortios	146	25	121	17,1%	82,9%
Total	152	30	122		

Nota: C. Rubio y K. Terán

Se analizaron un total de 152 bacterias, después de aislarlas se determinó 146 consorcios y 6 bacterias aisladas. Al sembrar las bacterias aisladas en medios de cultivo con concentraciones de Cd se obtuvo 5 bacterias resistentes y/o tolerantes al Cd y 1 sensible al metal.

6.2. Morfología bacteriana

Tabla 9.

Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias

CEPAS	TINCIÓN GRAM (+/-)	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	OXIDASA
CdM201	-	Bacilos aislados formando cadenas	Colonias blancuzcas de forma irregular	-
M5Pb2(2)A	-	Bacilos organizados por cadenas con ramificaciones	Colonias blancuzcas de forma circular	+
LPS01Cr1	-	Bacilos unidos en cadenas	Colonias blancuzcas de forma circular pequeñas, aglomeradas	+
M1Cr1	-	Bacilos unidos en cadenas	Colonias amarillentas, aglomeradas	+
LPS01Pb1(2)A	-	Bacilos aglomerados	Colonia blancuzca, aglomerada	+

Nota: C. Rubio y K. Terán

En la tabla 9 se describe las características macroscópicas como el color y la forma. Se identificó que el 80% de las cepas aisladas presentan un color blancuzco con morfología de colonia densa. En cuanto a las características microscópicas el 100% tienen forma de bacilos, además el 80% de las bacterias son oxidasa positiva y el 20 % es negativo

6.3. Perfil bioquímico de las bacterias

Tabla 10.

Aplicación de pruebas bioquímicas mediante el Kit Microgen GnA+B-ID.

Reacción	No. Agujero	Oxidasa	CdM201	M5Pb2(2) A	LPS1Cr1	M1Cr1	LPS01Pb1(2)	
			(-)	(+)	(+)	(+)	A	(+)
GN A Wells		Motilidad	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
		Nitrato	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	
		Lisina	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	
		1	Ornitina	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
		2	H₂S	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		3	Glucosa	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
		4	Manitol	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
		5	Xilosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
		6	ONPG	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
		7	Indol	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
		8	Ureasa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		9	V.P.	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
10		Citrato	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
11		TDA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
GN B Wells	12	Gelatina	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	
	13	Malonato	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
	14	Inositol	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	15	Sorbitol	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
	16	Ramnosa	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	
	17	Sacarosa	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	
	18	Lactosa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	19	Arabinosa	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	
	20	Adonitol	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
	21	Rafinosa	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	
	22	Salicina	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
	23	Arginina	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
	24							

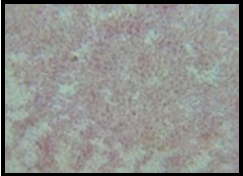
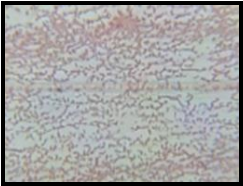
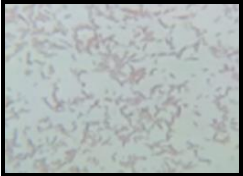
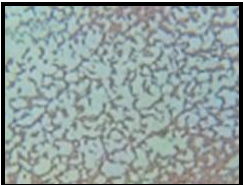
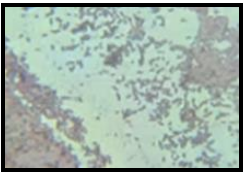
Nota: C. Rubio y K. Terán

La tabla 10 expone los resultados que se generaron de las pruebas bioquímicas empleando el Kit Microgen GnA+B-ID y el Software Microgen Identification (MID-60) para identificar la bacteria aislada.

6.4. Perfil microscópico de las bacterias

Tabla 11.

Características Microscópicas

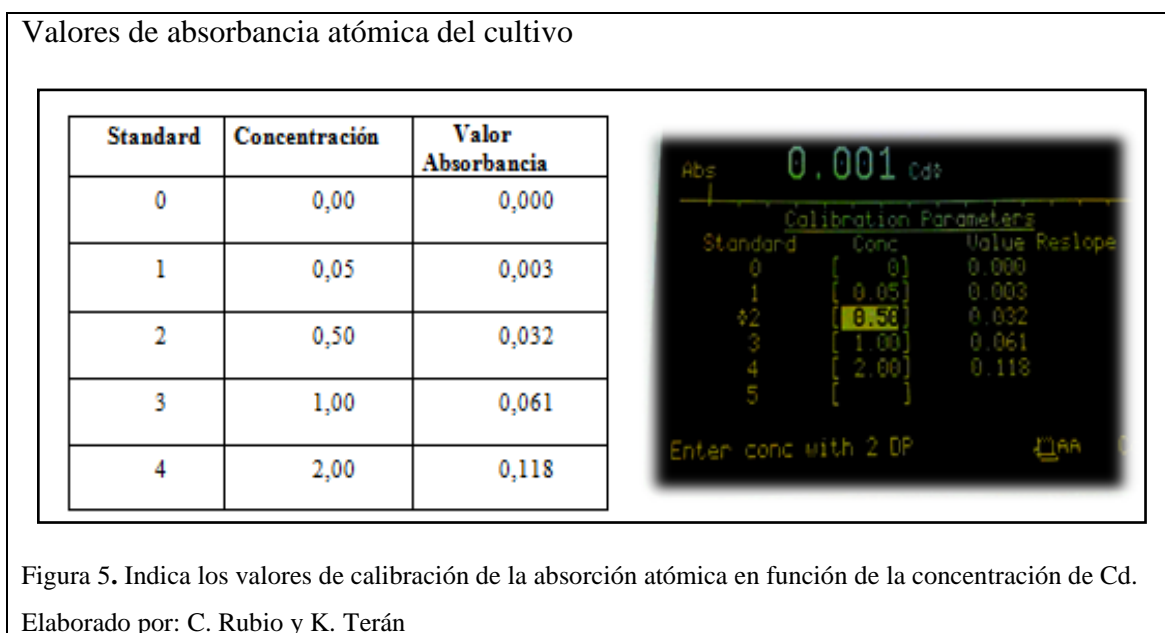
CEPAS	IDENTIFICACIÓN	% DE CERTEZA	FOTOGRAFÍA MICROSCÓPICA	APLICACIÓN EN BIORREMEDIACIÓN
CdM201	<i>Acinetobacter sp</i>	50,70		Remediación de suelos contaminados con PCBs e hidrocarburos.
LPS01Cr1	<i>Pseudomona sp</i> (Morfología fenotípica 1)	64,5		Puede remover metales pesados como Arsénico y tolerarlos a altas concentraciones.
M1Cr1	<i>Pseudomona sp</i> (Morfología fenotípica 2)	70		Utilizar estos hidrocarburos como fuente de carbono y energía necesaria para su crecimiento, generando productos más sencillos.
M5Pb2(2)A	<i>Aeromona Hydrophila</i>	93,80		Tolerante al plomo. Responder con rapidez a cambios en las condiciones ambientales, lo que permite su ubicuidad en los medios acuáticos. Degrada colorantes tipo azo, antraquinona y trifenilmetano.
LPS01Pb 1(2)A	<i>Aeromona sp</i>	64,5		Solubilizador de fosfato, degradan la quinina

Nota: C. Rubio y K. Terán

Después de realizar las pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas, en la Tabla 11 se exhibe el porcentaje de certeza para su identificación, si el valor es de 95% o mayor a este, se acerca significativamente a la especie, en cambio si el valor es menor se acerca al género.

De acuerdo a los resultados adquiridos, todas las bacterias se aproximan al género.

6.5. Curva de calibración de Cd



A partir de los datos de absorbancia y de la concentración de Cd, se elaboró la curva de calibración de Cd en el equipo de absorción atómica como se presenta en la Figura 6.

Curva de calibración de Cd

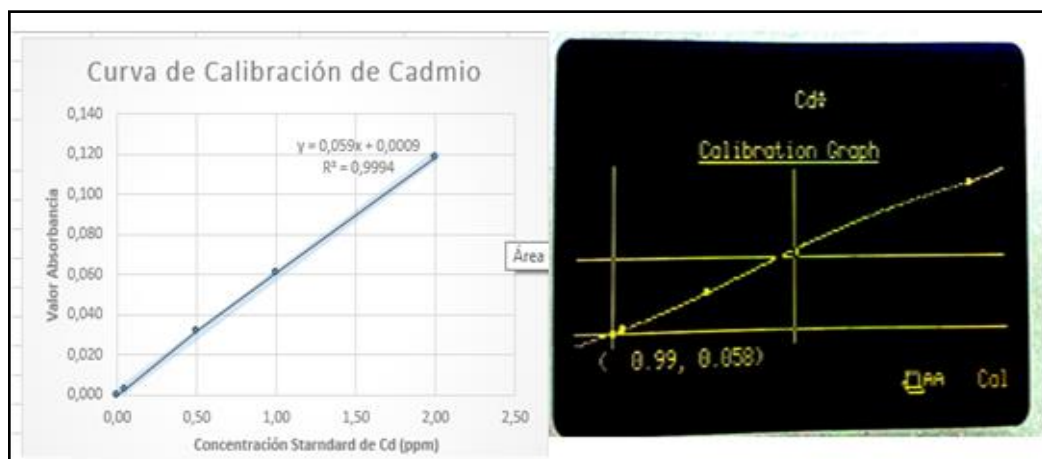


Figura 6. Curva de calibración de la absorción atómica en función de la concentración de Cd
Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

Con la elaboración de la curva de calibración de Cd se obtuvo la ecuación (13):

$$y = 0.059(x) + 0.0009 \quad (13)$$

En donde

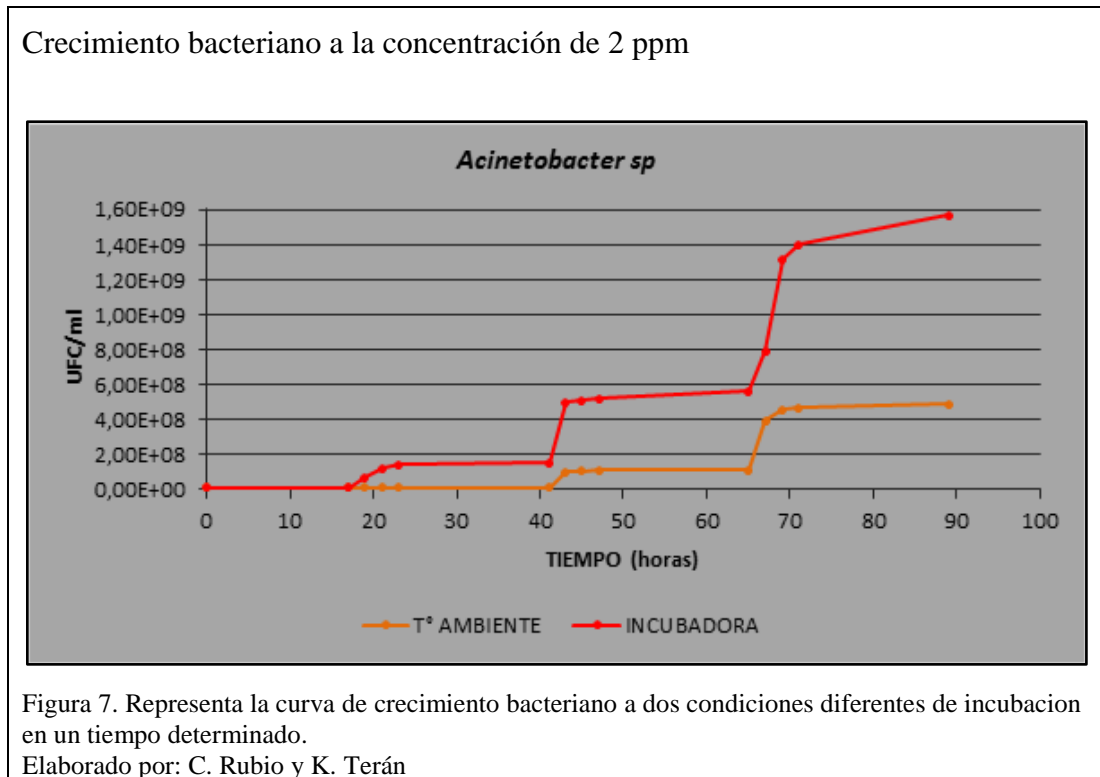
Y = Valor de la absorbancia atómica del cultivo

X = Concentración estándar de Cd

El estadístico R cuadrado ajustado fue de 0.994, valor que fue calculado automáticamente por el equipo de absorción atómica, lo que demuestra una relación aceptable entre la variable y su respuesta.

6.6. Cinética de crecimiento bacteriano y remoción de Cd.

CEPA 1. *Acinetobacter sp.* (CdM201)



En la Figura 7. se aprecia la curva de crecimiento bacteriano de la cepa *Acinetobacter sp.* a la concentración de 2 ppm de Cd, en el cual se evidencia un aumento de la concentración de las bacterias y un desarrollo favorable en el transcurso del tiempo de experimentación, tanto en la incubación a una temperatura controlada de 25°C como a temperatura ambiente, estos resultados muestran las buenas condiciones fisiológicas que tuvieron las bacterias a pesar que se encontraban a distintas condiciones de incubación. Mientras que a la concentración de 10 ppm no se observó crecimiento, en consecuencia no se muestran los resultados.

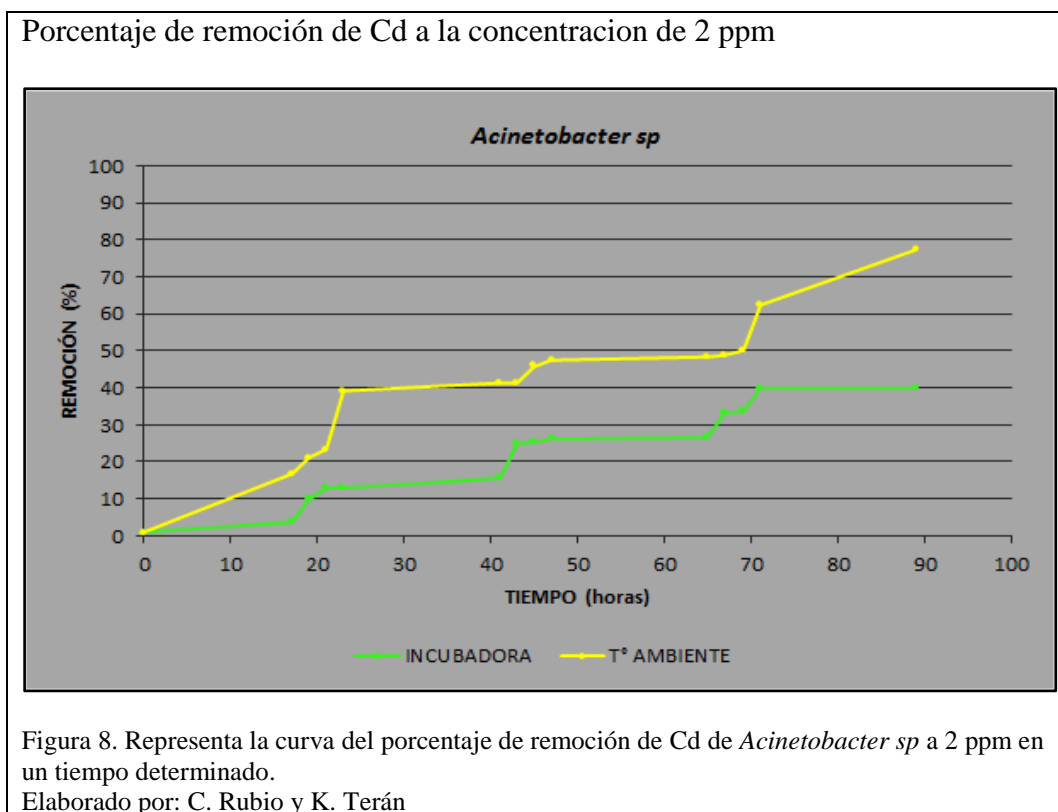
La Tabla 12 muestra el tiempo en que la bacteria se duplica en incubación a temperatura controlada de 25°C y a temperatura ambiente a la concentración de 2 ppm.

Tabla 12.

Datos del crecimiento bacteriano a la concentración de 2 ppm de la cepa *Acinetobacter sp*

Condiciones Ambientales	Tiempo (Horas)	Tiempo de generación (Horas)	Velocidad de crecimiento (Generaciones/Horas)
Temperatura controlada a 25°C	89	12,43	0,08
Temperatura ambiente	89	16,87	0,06

Nota: C. Rubio y K. Terán



En la Figura 8 se presenta la curva de remoción de Cd de la cepa de *Acinetobacter sp* a la concentración de 2, se evidencia que en la incubación a la temperatura controlada de 25 °C hay una remoción de 39,97%, mientras que a temperatura ambiente hubo una remoción significativa de 77,49%.

Temperatura interna del cultivo

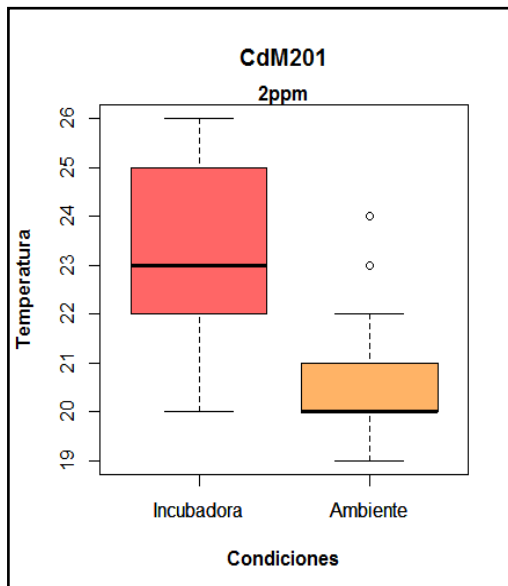


Figura 9. Indica los valores de temperatura interna del cultivo a dos condiciones de incubación diferentes. Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

En la Figura 9 se muestra la temperatura interna de la cepa *Acinetobacter sp.*, a la concentración de 2 ppm de Cd, después de haber sido incubada a dos diferentes condiciones de temperatura. A una temperatura controlada de 25 °C, la media de la temperatura interna del cultivo fue aproximadamente de 23,46 °C y su rango es de 20 a 26 °C y a temperatura ambiente la media de la temperatura interna del cultivo es aproximadamente de 20,69 °C con un rango de 19 a 22 °C.

pH de desarrollo

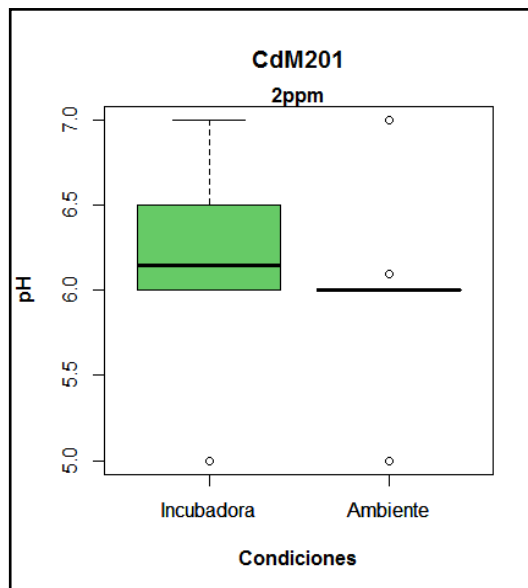
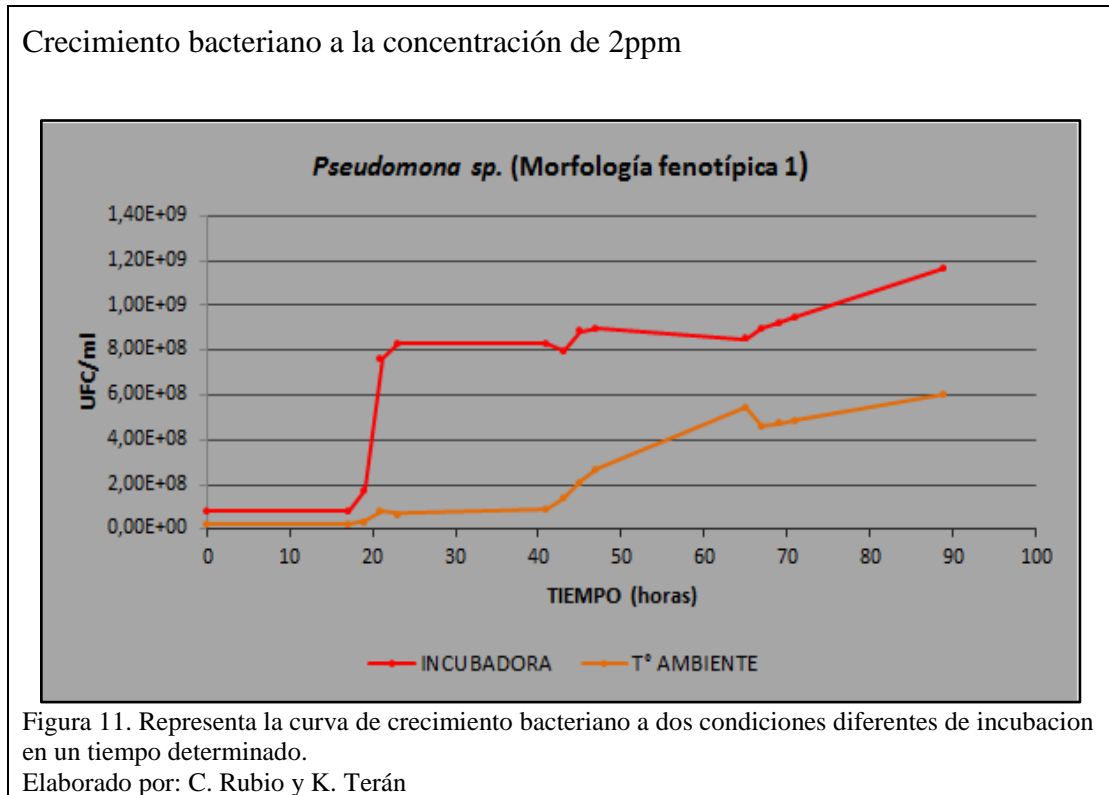


Figura 10. Indica los valores de pH a concentraciones de 2 ppm de *Acinetobacter sp* a dos condiciones de incubación diferentes. Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

La Figura 10 presenta la variación del pH de la cepa *Acinetobacter sp*. a la concentración de 2 ppm a dos diferentes condiciones de temperatura, a una temperatura controlada de 25 °C la media del pH fue aproximadamente de 6,27 y su rango varía de 6 a 7; mientras que a temperatura ambiente la media es aproximadamente de 6.

CEPA 2. *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 1) (LPS01Cr1)



En la Figura 11 se aprecia la curva de crecimiento bacteriano de la cepa *Pseudomona sp* (Morfología fenotípica 1) a la concentración de 2 ppm de Cd, en el cual se evidencia un aumento de la concentración de las bacterias y un desarrollo favorable en el transcurso del tiempo de experimentación, tanto en la incubación a una temperatura controlada de 25°C como a temperatura ambiente, estos resultados muestran las buenas condiciones fisiológicas que tuvieron las bacterias a pesar que se encontraban a distintas condiciones de incubación. Mientras que a la concentración de 10 ppm no se observó crecimiento, en consecuencia no se muestran los resultados.

La Tabla 13 muestra el tiempo en que la bacteria se duplica en condiciones de temperatura ambiente e incubadora a la concentración de 2 ppm.

Tabla 13.

Datos del crecimiento bacteriano a la concentración de 2 ppm de la cepa *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 1)

Condiciones Ambientales	Tiempo (Horas)	Tiempo de generación (Horas)	Velocidad de crecimiento (Generaciones/Horas)
Temperatura controlada a 25°C	89	22,82	0,04
Temperatura ambiente	89	17,63	0,06

Nota: C. Rubio y K. Terán

Porcentaje de remoción a la concentración de 2ppm de Cd

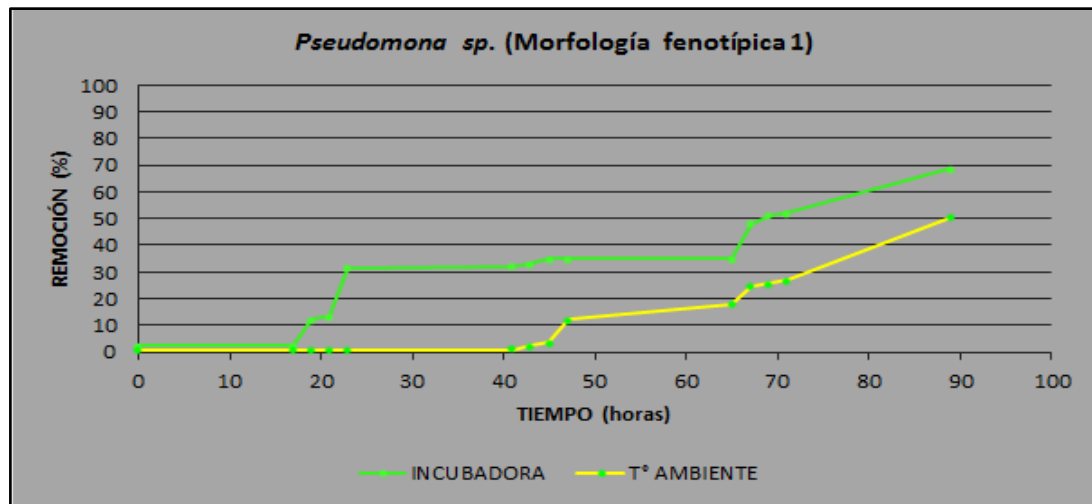
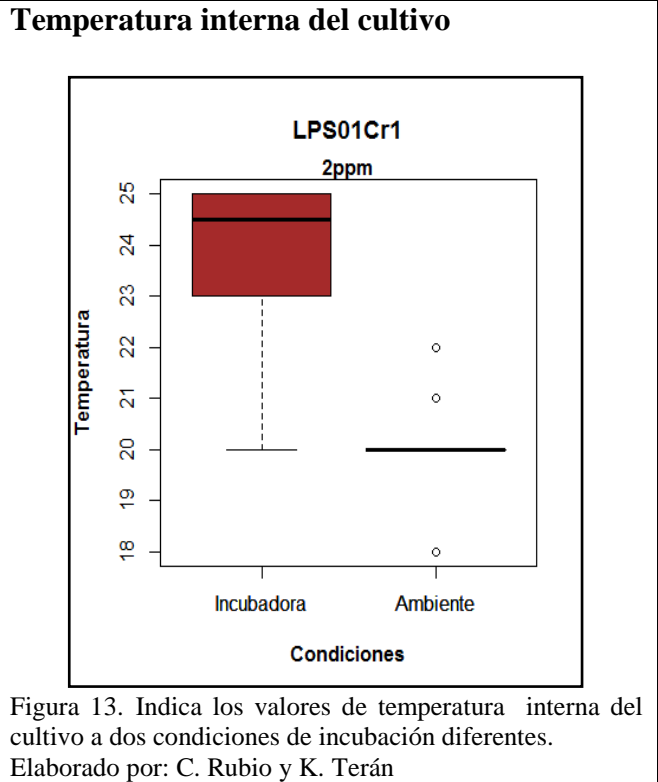


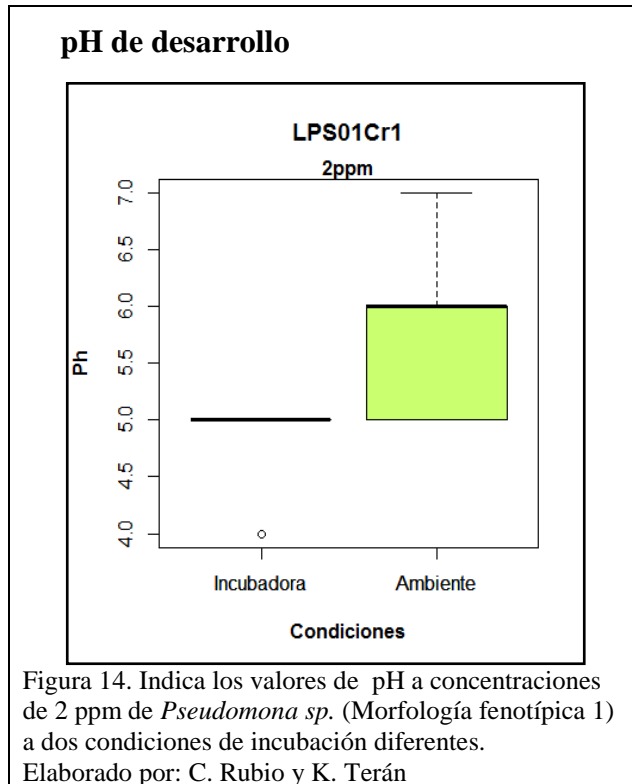
Figura 12. Representa la curva del porcentaje de remoción de Cd de *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 1) a 2 ppm en un tiempo determinado.

Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

En la Figura 12 se presenta la curva de remoción de Cd de la cepa de *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 1) a la concentración de 2 ppm, se evidencia que en la incubación a la temperatura controlada de 25 °C hay una remoción de 68,78%, mientras que a temperatura ambiente hubo una remoción significativa de 50,48%.



En la Figura 13 se muestra la temperatura interna de la cepa *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 1), a la concentración de 2 ppm de Cd, después de haber sido incubada a dos diferentes condiciones de temperatura. A una temperatura controlada de 25 °C, la media de la temperatura interna del cultivo fue aproximadamente de 23,74 °C y su rango es de 20 a 25 °C y a temperatura ambiente la media de la temperatura interna del cultivo es aproximadamente de 20,16 °C, con un rango que varía de 18 a 22 °C.



La Figura 14 presenta la variación del pH de la cepa *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 1), a la concentración de 2 ppm a dos diferentes condiciones de temperatura, a una temperatura controlada de 25 °C la media del pH fue aproximadamente de 4,84; mientras que a temperatura ambiente la media del pH es aproximadamente de 5,60, con un rango que varía de 5 a 7.

CEPA 3. *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 2) (M1Cr1)

Crecimiento bacteriano a la concentración de 2ppm

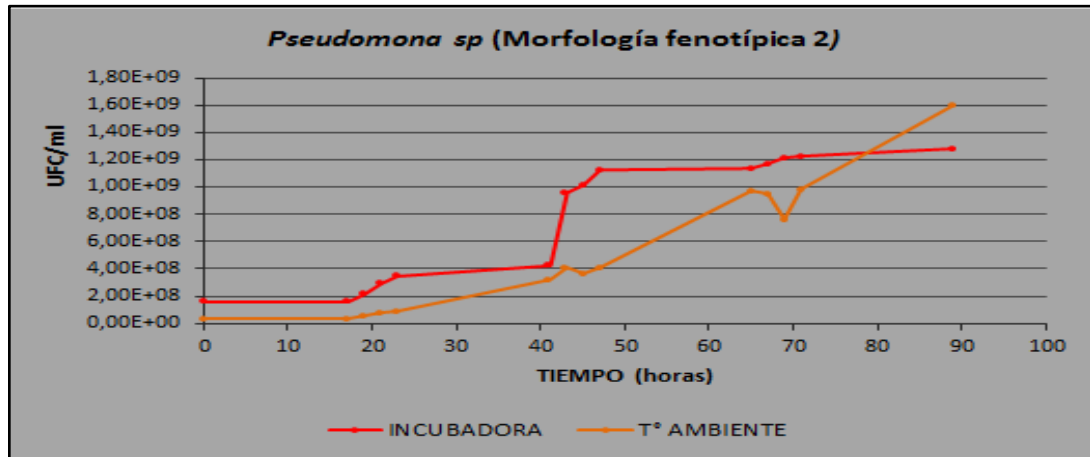


Figura 15. Representa la curva de crecimiento bacteriano a dos condiciones diferentes de incubacion en un tiempo determinado..

Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

En la Figura 15 se aprecia la curva de crecimiento bacteriano de la cepa *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 2) a la concentración de 2 ppm de Cd, en el cual se evidencia un aumento de la concentración de las bacterias y un desarrollo favorable en el transcurso del tiempo de experimentación, tanto en la incubación a una temperatura controlada de 25°C como a temperatura ambiente, estos resultados muestran las buenas condiciones fisiológicas que tuvieron las bacterias a pesar que se encontraban a distintas condiciones de incubación. Mientras que a la concentración de 10 ppm no se observó crecimiento, en consecuencia no se muestran los resultados.

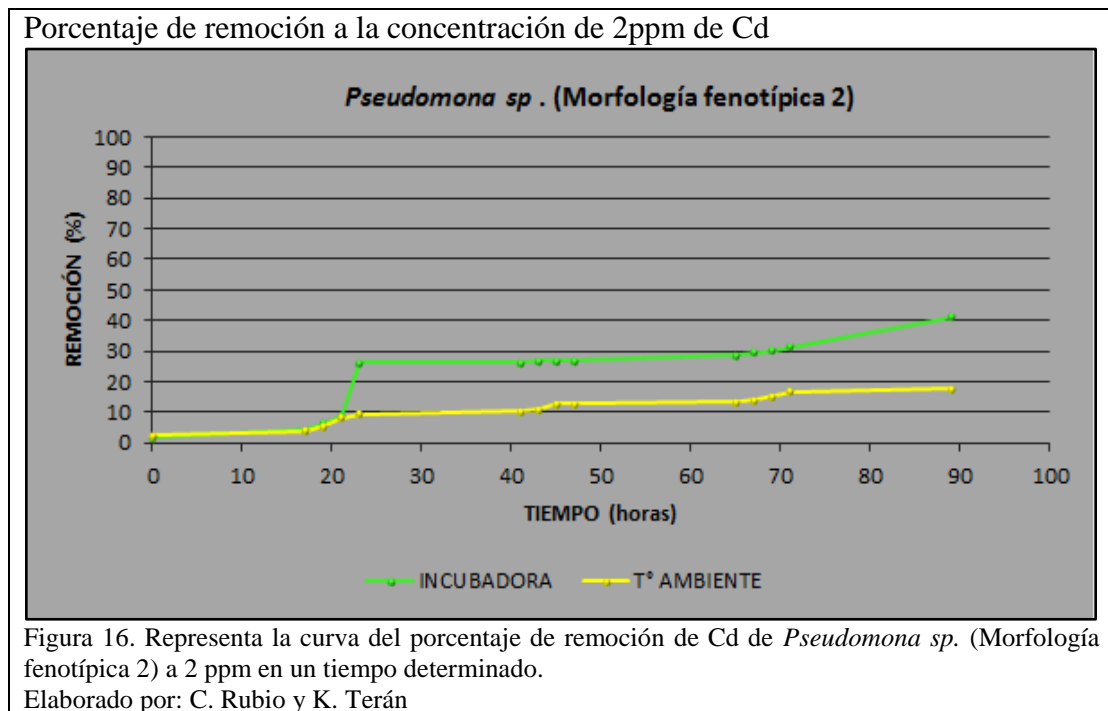
La Tabla 14 muestra el tiempo en que las bacteria se duplica en condiciones de temperatura ambiente e incubadora a la concentración de 2 ppm.

Tabla 14.

Datos del crecimiento bacteriano a la concentración de 2 ppm de la cepa *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 2).

Condiciones Ambientales	Tiempo (Horas)	Tiempo de generación (Horas)	Velocidad de crecimiento (Generaciones/Horas)
Temperatura controlada a 25°C	89	14,47	0,07
Temperatura ambiente	89	15,76	0,06

Nota: C. Rubio y K. Terán



En la Figura 16 se presenta la curva de remoción de Cd de la cepa de *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 2) a la concentración de 2 ppm, se evidencia que en la incubación a la temperatura controlada de 25 °C hay una remoción de 41,04%, mientras que a temperatura ambiente hubo una remoción significativa de 17,79%.

Temperatura interna del cultivo

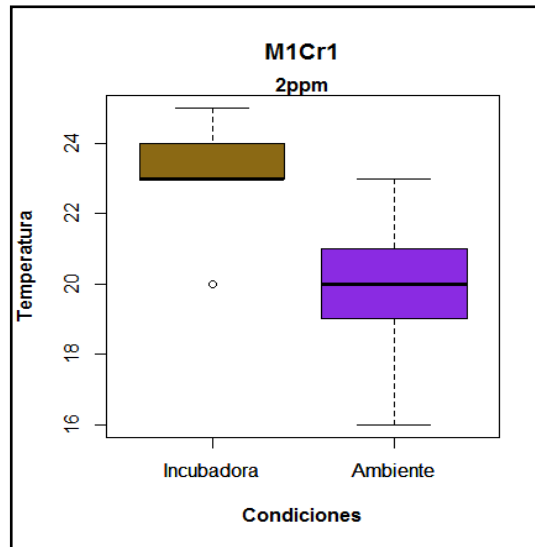
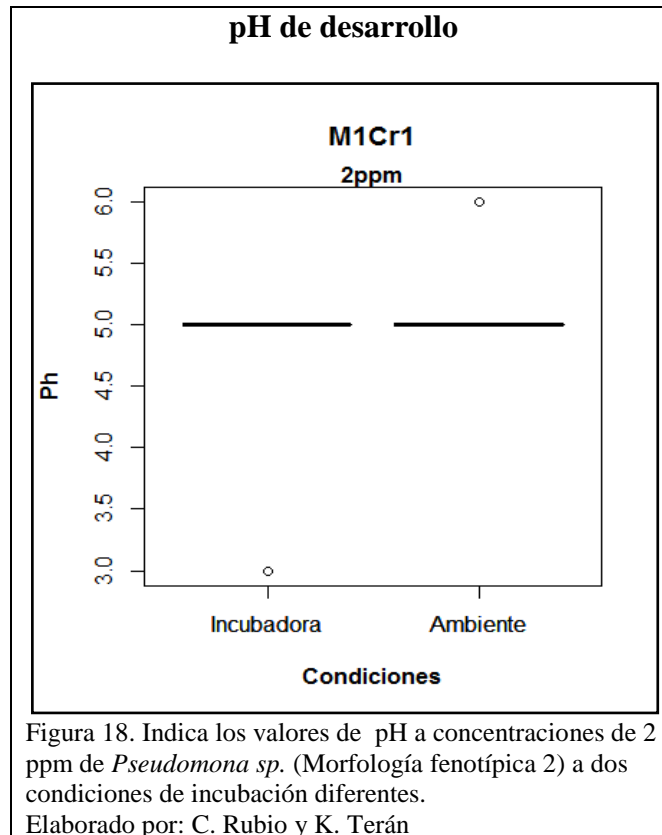


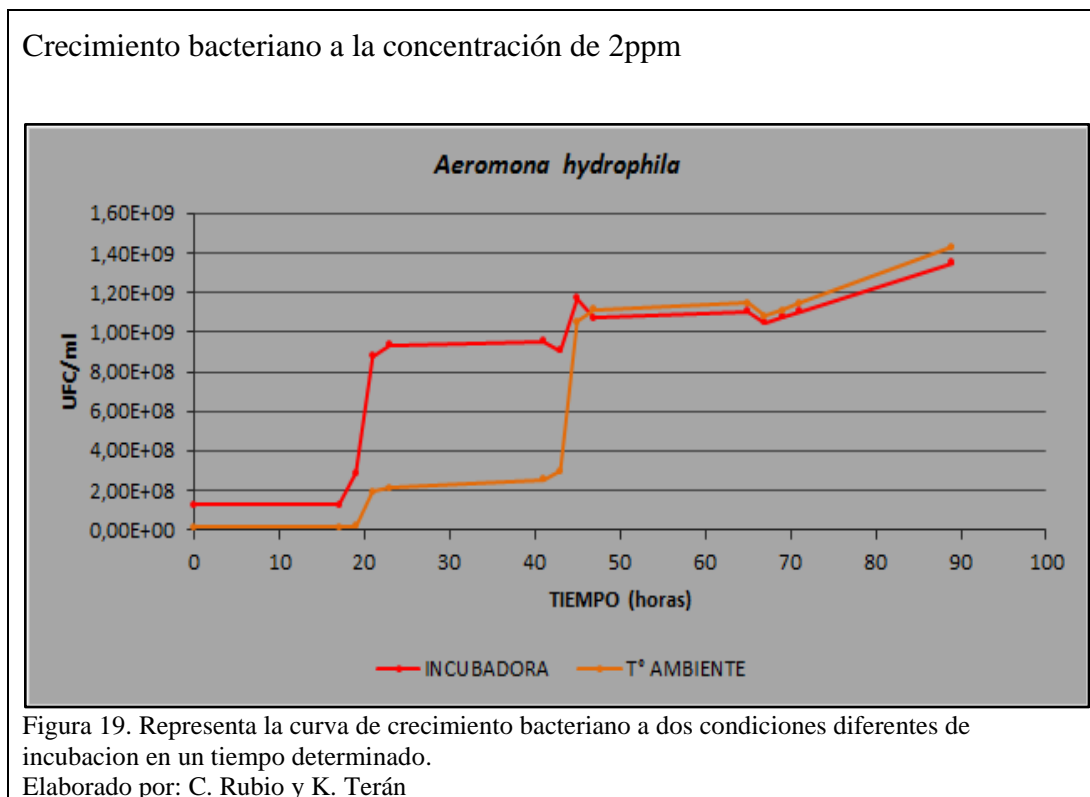
Figura 17. Indica los valores de temperatura interna del cultivo a dos condiciones de incubación diferentes.
Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

En la Figura 17 se muestra la temperatura interna de la cepa *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 2), a la concentración de 2 ppm de Cd, después de haber sido incubada a dos diferentes condiciones de temperatura. A una temperatura controlada de 25 °C, la media de la temperatura interna del cultivo fue de 23 °C y su rango varía de 23 a 25 °C y a temperatura ambiente la media de la temperatura interna del cultivo es aproximadamente de 19,69 °C con un rango que varía de 16 a 21 °C.



La Figura 18 presenta la variación del pH de la cepa *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 2), a la concentración de 2 ppm a dos diferentes condiciones de temperatura, a una temperatura controlada de 25 °C la media del pH fue aproximadamente de 4,85; mientras que a temperatura ambiente la media es aproximadamente de 5,08.

Cepa 4. *Aeromona hydrophila* . (M5Pb2(2)A)



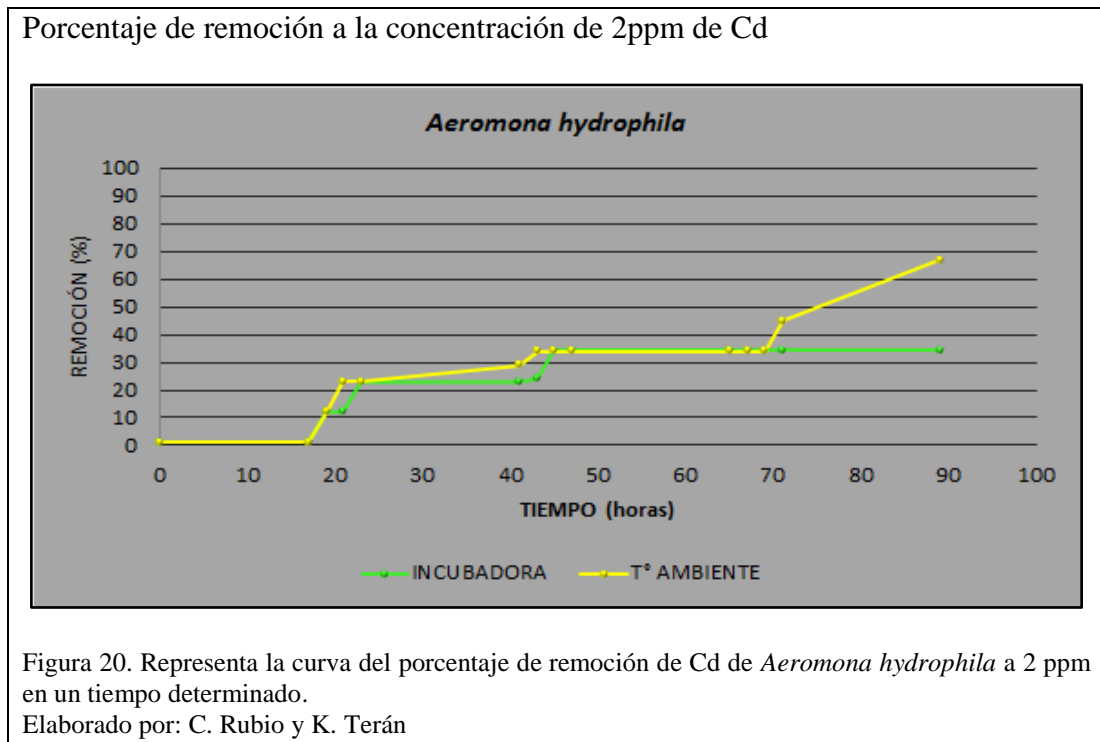
En la Figura 19. Se muestra la curva de crecimiento bacteriano de la cepa *Aeromona hydrophila* a la concentración de 2 ppm de Cd, en el cual se evidencia un aumento de la concentración de las bacterias y un desarrollo ascendente en el transcurso del tiempo de experimentación, tanto en la incubación a una temperatura controlada de 25°C como a temperatura ambiente, estos resultados muestran las buenas condiciones fisiológicas que tuvieron las bacterias a pesar que se encontraban a distintas condiciones de incubación. Mientras que a la concentración de 10 ppm no se observó crecimiento, en consecuencia no se muestran los resultados.

La tabla 15 muestra el tiempo en que las bacteria se duplica en condiciones de temperatura ambiente e incubadora a concentraciones de 2 ppm.

Tabla 15.
 Datos del crecimiento bacteriano a la concentración de 2 ppm de la cepa *Aeromona hydrophila*.

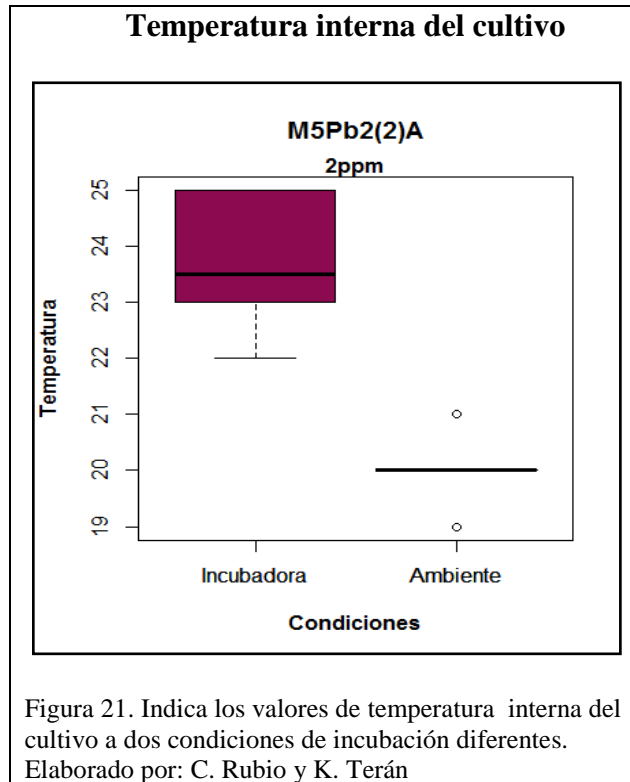
Condiciones Ambientales	Tiempo (Horas)	Tiempo de generación (Horas)	Velocidad de crecimiento (Generaciones/Horas)
Temperatura controlada a 25°C	89	26,10	0,04
Temperatura ambiente	89	13,23	0,08

Nota: Rubio, C., Terán K, 2016

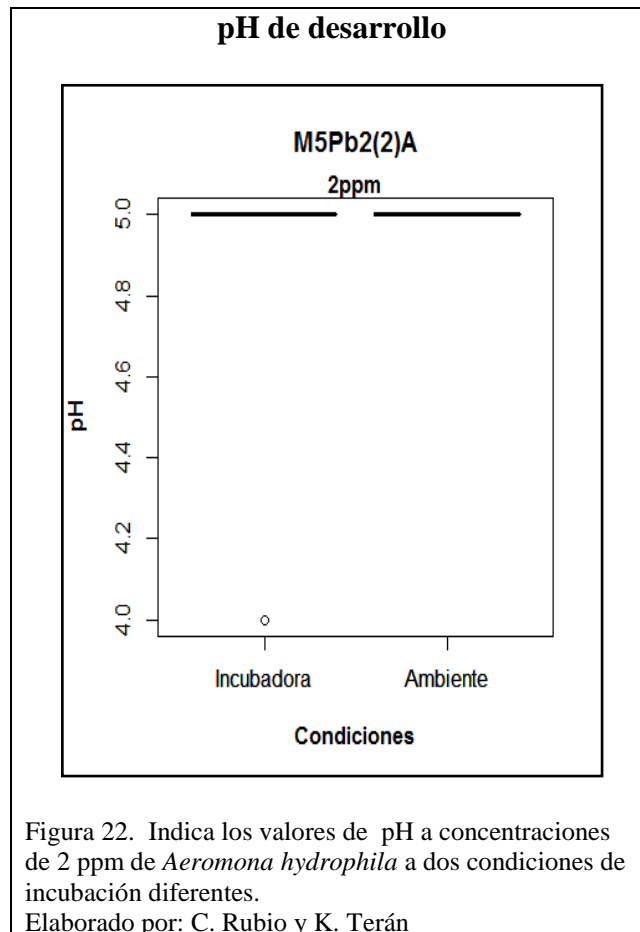


En la Figura 20 se presenta la curva de remoción de Cd de la cepa *Aeromona hydrophila* a la concentración de 2 ppm, se evidencia que en la incubación a la temperatura

controlada de 25 °C hay una remoción de 33,97%, mientras que a temperatura ambiente hubo una remoción significativa de 66,98%.



En la Figura 21 se muestra la temperatura interna de la cepa *Aeromonas hydrophila*, a la concentración de 2 ppm de Cd, después de haber sido incubada a dos diferentes condiciones de temperatura. A una temperatura controlada de 25 °C, la media de la temperatura interna del cultivo fue aproximadamente de 23,74 °C y su rango varía de 22 a 25 °C y a temperatura ambiente la media de la temperatura interna del cultivo es aproximadamente de 20,16 °C.



La Figura 22 presenta la variación del pH de la cepa *Aeromonas hydrophila*, a la concentración de 2 ppm a dos diferentes condiciones de temperatura, a una temperatura controlada de 25 °C la media del pH fue aproximadamente de 4,85; mientras que a temperatura ambiente la media es aproximadamente de 5.

CEPA 5. *Aeromonas sp* (LPS01Pb1(2)A)

Crecimiento bacteriano a la concentración de 2ppm

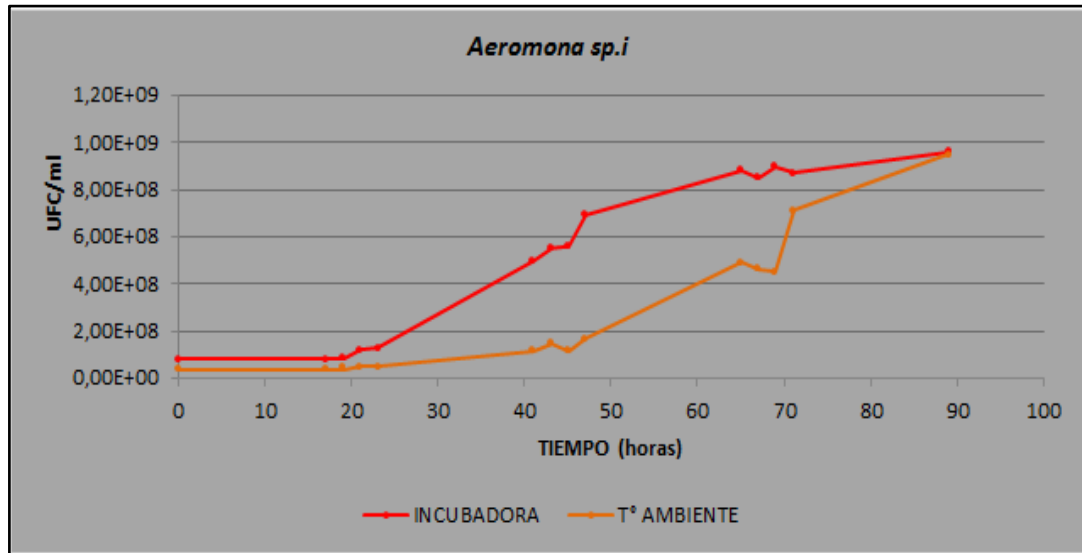


Figura 23. Representa la curva de crecimiento bacteriano a dos condiciones diferentes de incubacion en un tiempo determinado.
Elaborado por: C. Rubio y K. Terán.

En la Figura 23. Se aprecia la curva de crecimiento bacteriano de la cepa *Aeromonas sp* a la concentración de 2 ppm de Cd, en el cual se evidencia un aumento de la concentración de las bacterias y un desarrollo ascendente en el transcurso del tiempo de experimentación, tanto en la incubación a una temperatura controlada de 25°C como a temperatura ambiente, estos resultados muestran las buenas condiciones fisiológicas que tuvieron las bacterias a pesar que se encontraban a distintas condiciones de incubación. Mientras que a la concentración de 10 ppm no se observó crecimiento, en consecuencia no se muestran los resultados.

La Tabla 16 muestra el tiempo en que las bacteria se duplica en condiciones de temperatura ambiente e incubadora a concentraciones de 2 ppm.

Tabla 16.

Datos del crecimiento bacteriano a la concentración de 2 ppm de la cepa *Aeromona sp.*

Condiciones Ambientales	Tiempo (Horas)	Tiempo de generación (Horas)	Velocidad de crecimiento (Generaciones/Horas)
Temperatura controlada a 25°C	89	24,43	0,04
Temperatura ambiente	89	18,86	0,05

Nota: C. Rubio y K. Terán

Porcentaje de remoción a la concentración de 2ppm

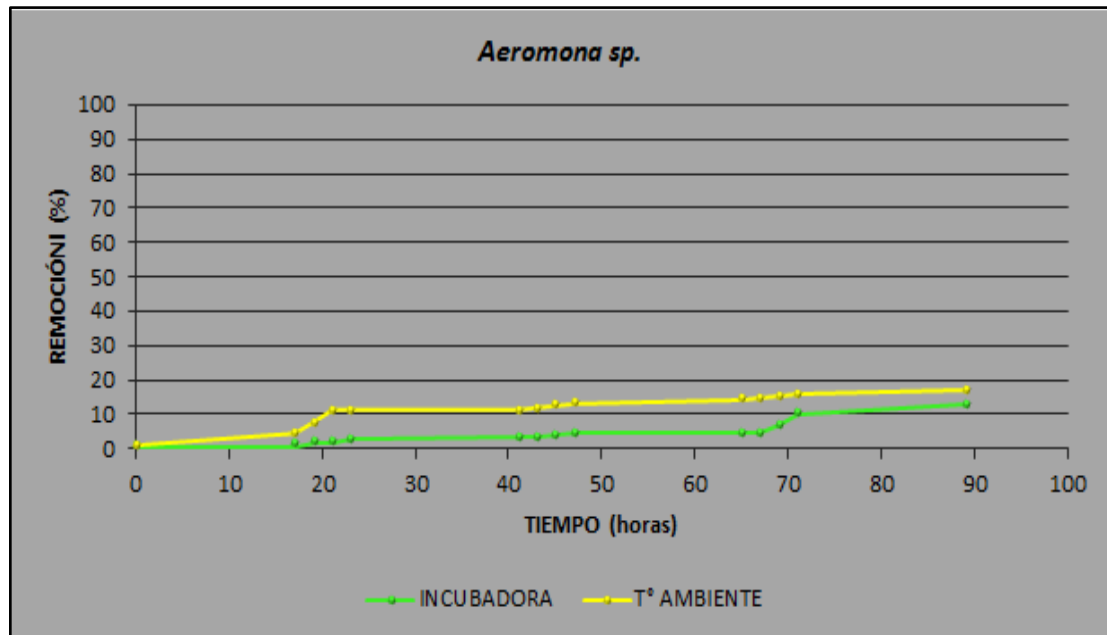
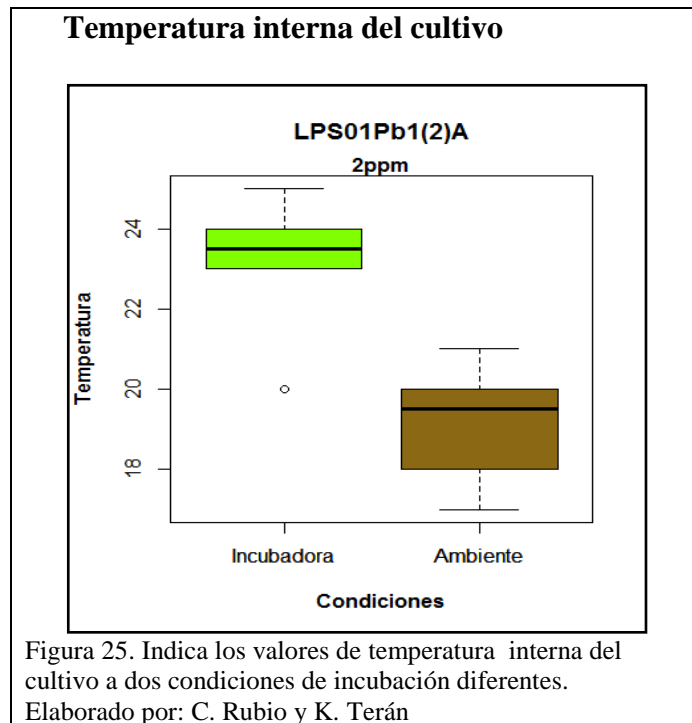


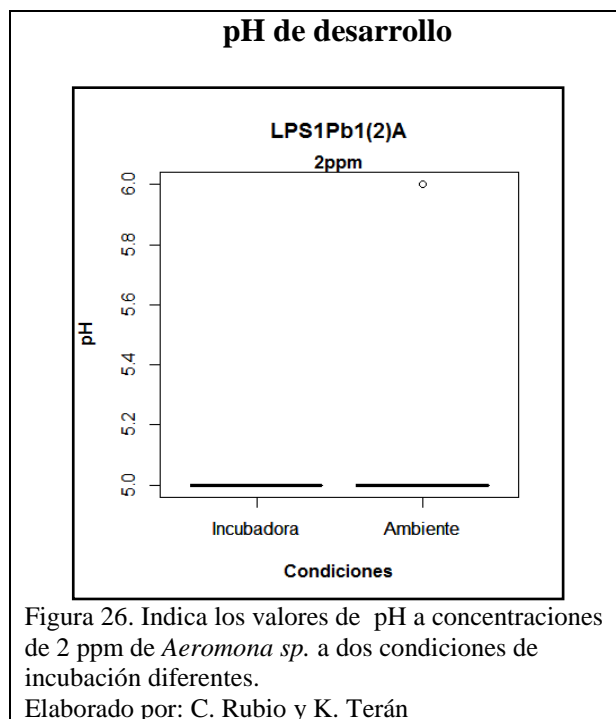
Figura 24. Representa la curva del porcentaje de remoción de Cd de *Aeromona sp.* a 2 ppm en un tiempo determinado.

Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

En la Figura 24 se presenta la curva de remoción de Cd de la cepa *Aeromona sp.* a la concentración de 2 ppm, se evidencia que en la incubación a la temperatura controlada de 25 °C hay una remoción de 12,80%, mientras que a temperatura ambiente hubo una remoción significativa de 16,96%.



En la Figura 25 se muestra la temperatura interna de la cepa *Aeromona sp.*, a la concentración de 2 ppm de Cd, después de haber sido incubada a dos diferentes condiciones de temperatura. A una temperatura controlada de 25 °C, la media de la temperatura interna del cultivo fue aproximadamente de 23,15 °C y su rango varía de 23 a 25 °C y a temperatura ambiente la media de la temperatura interna del cultivo es aproximadamente de 19,15 °C, con un rango que varía de 17 a 21 °C.



La Figura 26 presenta la variación del pH de la cepa *Aeromonas sp.*, a la concentración de 2 ppm a dos diferentes condiciones de temperatura, tanto a una temperatura controlada de 25 °C como a temperatura ambiente la media es aproximadamente de 5.

Discusión de resultados

El estudio se realizó para analizar el efecto de las bacterias aisladas sobre las concentraciones de 2 ppm y 10 ppm de Cd en aguas residuales sintéticas. De acuerdo a los resultados presentados, las cepas crecieron satisfactoriamente a la concentración de 2 ppm, por el contrario, a la concentración de 10 ppm no se observó crecimiento bacteriano, es decir que no fueron resistentes y/o tolerantes al metal. Según (Cervantes et al., 2006, pág. 203), señala que las bacterias tienen diferentes mecanismos de resistencia para tolerar la toxicidad de los metales, algunos de ellos son: elementos propios de la célula que atrapan a los iones, neutralizando su toxicidad; enzimas que cambian el

estado Redox del metal para disminuir su toxicidad; mecanismos de transporte en la membrana celular que precipitan sustancias tóxicas. Referente a lo mencionado anteriormente se podría deducir que la inhibición del crecimiento de las bacterias en estudio se produjo debido a factores intrínsecos de los microorganismos, como la composición celular, función metabólica del microorganismo y la presencia de proteínas enlazadoras (Suárez & Reyes, 2002, pág. 163), ya que éstas se unen al metal inactivando la actividad biológica de la cepa y por ende su crecimiento.

En cuanto a la remoción de Cd se encontraron tres cepas de importancia que removieron más del 60% del metal. La primera es la del género *Acinetobacter sp.*, que mostró un porcentaje de remoción del 77,49% a la concentración de 2 ppm a temperatura ambiente, como condición más cercana a la realidad. No existen estudios similares que revelen la capacidad de remoción de la bacteria, no obstante los datos obtenidos por (Martínez et al., 2010, pág. 5) probaron que del total de cepas a incubadas a 37°C del género *Acinetobacter sp.*, el 66% presentaron resistencia a una concentración de 24 ppm de Cd en medio líquido. De acuerdo con lo expuesto anteriormente la cepa se adapta satisfactoriamente al medio de cultivo con concentraciones más altas de la experimentada. Sería importante continuar investigando sus propiedades para la remoción de metales, ya que en el experimento, la cepa presentó la velocidad de crecimiento más alta con un valor de 0,08 generaciones/hora en el menor tiempo de generación con 12,43 horas en relación a los datos de las cinco cepas analizadas.

La segunda cepa, *Pseudomona sp.* (Morfología fenotípica 1) removió un 68.78% del metal a 2 ppm en incubación a temperatura controlada de 25 °C, la capacidad de remoción de metales pesados por *Pseudomonas* ha sido investigada por varios autores,

entre ellos, el estudio de (Sinha & Kumar, 2009, pág. 658) quienes determinaron que *Pseudomona aeruginosa* removió el 75% del metal a una concentración de 3mM (equivalente a 337,2 ppm) de Cd en medio líquido. Aunque es una especie diferente a la de nuestro experimento, el resultado sostiene que el género *Pseudomona* puede remover metales pesados como el Cd. De acuerdo a (Guevara, 2010, pág. 2) *Pseudomona sp* “usa una variedad de compuestos orgánicos como sustrato para su crecimiento, puede ser aislada de una gran variedad de ambientes acuáticos como terrestres, por lo que es considerada ubicua

La tercera cepa es *Aeromona hydrophila* que removió un 66,98% a temperatura ambiente a la concentración de 2 ppm, con respecto a lo mencionado anteriormente no se han encontrado estudios similares, sin embargo existen investigaciones en los que la cepa presentó resistencia y/o tolerancia a otros metales entre los que se puede mencionar el plomo, el arsénico y el mercurio (Soto, Gutiérrez, Rey-león, & González, 2010, pág. 201) por consiguiente, se puede ratificar el potencial de resistencia que posee *Aeromona hydrophila*.

Los resultados del experimento muestran que la remoción de Cd manifestó sensibilidad al pH comprendido entre 4 y 5, a la concentración de 2 ppm, dado que a este rango no existe una tasa alta de remoción del metal. Por el contrario, en pH de 6 a concentración de 2 ppm, se desarrolló la mayor tasa de remoción. El análisis concuerda con otros investigadores como (Rodríguez, Ramírez, Mogollón, & Zaucher, 1997) que reportaron que a valores de pH menores a 4, la captura de Cd disminuyó entre un 30 y 60% lo que revela que las bacterias aisladas remueven el metal en pH ácido.

En general, las bacterias muestran diferencias en cuanto al nivel de captura del metal, debido a las características propias de cada biomasa microbiana como la actividad fisiológica y bioquímica, la dotación genética y la diversidad de la composición química de la pared celular, unida a la característica del metal, que influye en la afinidad de las biomasas (Carballo et al., 2012, p. 39).

Conclusiones

- A partir de las muestras residuales se examinaron 152 colonias, de las cuales se determinó 146 consorcios y 6 colonias puras. Al exponer las colonias puras a diferentes concentraciones de Cd, 5 bacterias con características morfológicas diferentes fueron resistentes y/o tolerantes al metal, adaptándose favorablemente al medio de cultivo.
- Todas las bacterias desarrollaron tolerancia a la concentración de 2 ppm de Cd, mientras que a la concentración de 10 ppm, las bacterias no mostraron resistencia y/o tolerancia inhibiendo su crecimiento.
- Mediante la aplicación de las pruebas bioquímicas se identificaron los siguientes géneros: *Acinetobacter sp*, *Pseudomona sp*. (Morfología fenotípica 1), *Pseudomona sp*. (Morfología fenotípica 2), *Aeromona hydrophila*, *Aeromona sp*, ninguna de las bacterias se acercó a la especie ya que no presentaron un porcentaje de certeza mayor al 95%.
- Las bacterias que desarrollaron mayor eficiencia de remoción fueron *Acinetobacter sp* con el 77,49% de remoción, seguido por *Pseudomona sp*.

(Morfología fenotípica 1) con el 68,78% y *Aeromona hydrophila* con 66,98% a la concentración de 2 ppm.

Recomendaciones

- Las bacterias en estudio no mostraron resistencia a la concentración de 10 ppm de Cd, por lo tanto, no se recomienda realizar estudios posteriores con esta concentración.
- Se recomienda usar estas cepas bacterianas con otros metales pesados para evaluar su tolerancia y capacidad de remoción.

Referencias

- Acebo, D., & Hernández, A. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(1), 5.
- Acosta, M., & Montilla, J. (2011). *Evaluación De La Contaminación Por Cadmio Y Plomo En Agua, Suelo, Y Sedimento Y Analisis De Impactos Ambientales En La Subcuenca Del Rio Balsillas Afluente Del Rio Bogotá*. UNIVERSIDAD LA SALLE.
- Alanís, E., & Guerrero, I. (2004). Pseudomonas en Biotecnología. *Revista Bio Tecnología*, 09(1), 26. Retrieved from http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2004_1/Pseudomonas.pdf
- Aldás, A. (2004). *Estudio de la calidad del agua para uso zootécnico en porcinos; evaluación del impacto ambiental y biorremediación*. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.
- Alí López, N., & Lozada, J. (2011). USO DE BIORREMEDIACIÓN PARA EL SANEAMIENTO DE SUSTRATOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO EN EL ORIENTE DE VENEZUELA. *Ecodiseño & Sostenibilidad*, 227–236.
- Argota, G., Argota, H., Larramendi, D., Mora, Y., Fimia, R., & Iannacone, J. (2012). Histología y química umbral de metales pesados en hígado, branquias y cerebro de *Gambusia punctata* (Poeciliidae) del río Filé de Santiago de Cuba. *Revista Electronica de Veterinaria*, 13(5), 2.
- Barrios, Y. (2011). Biorremediación: Una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo. *Bioteχνología Aplicada*, 28(2), 62. <http://doi.org/10.4067/S0718-0764201100>
- Carballo, M., Martínez, A., Salgado, I., Maldener, I., Álvarez, M., Boza, A., ... Cruz, M. (2012). Capacidad de captura de cadmio y cinc por bacterias , microalgas y levaduras Cadmium and zinc uptake capacity by bacterias , microalgae and yeasts, 1, 35.

- Carreras, B. (2011). Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. *Revista CORPOICA. Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 12, 129. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2012/CO/CO1201.xml;CO2012003791>
- Castro, L. (2012). *Biorreducción del hierro: desarrollo de alternativas medioambientales limpias para la obtención del metal*. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
- Cervantes, C., Espino, A., Acevedo, F., León, R., Rivera, M., Avila, M., ... Moreno, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48.
- Díaz, M. (2014). *Concentración de cadmio en la sangre en una población laboral hospitalaria y su relación con factores asociados*. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
- Echeverri, G., Manjarrez, G., & Cabrera, M. (2011). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena , Colombia. *Nova*, 8(13), 84.
- Escorza, J. (2007). *Estudio De Inóculos Bacterianos Como Biorremediadores De Suelos Contaminados Con Petróleo*. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. Retrieved from <http://dspace.epoch.edu.ec/handle/123456789/220>
- Gallegos, W., Vega, M., & Noriega, P. (2012). Espectroscopía de absorción atómica con llama y su aplicación para la determinación de plomo y control de productos cosméticos. *La Granja*, 15(1), 19.
- Gavilánez, T. (2013). *Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en biorremediación*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.
- Guevara, J. (2010). Efecto de la concentración de jabón doméstico a diferentes temperaturas sobre el desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* MBLAM-02 , aislada

del río Moche (Perú) . *Universidad Nacional de Trujillo*.

- Gutiérrez, S. (2015). *Estudio de la Bioadsorción de Cadmio y Plomo con Biomasa de Serratia marcescens M8a-2T, a Nivel de Laboratorio.*”. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. Retrieved from <https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=56d26b65-405b-3057-62a3-bfabadc3a959&documentId=6c5c09f6-7b05-352c-b9ac-536af1cc53f3>
- Lima, L., Olivares-Rieumot, S., Columbie, I., Rosa, D., & Gil, R. (2005). NIVELES DE PLOMO, ZINC, CADMIO Y COBRE EN EL RÍO ALMENDARES, CIUDAD HABANA, CUBA. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 53(9), 116. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Lucana, M., & Huanca, R. (2014). BACTERIAS GRAM NEGATIVAS. *Revista de Actualización Clínica*, 49(1), 2589.
- Marca, C., Canales, M., Tobal, F., & Escudero, P. (2011). La pulsioximetría y su aplicación en pruebas de esfuerzo máximo. *Apunts Medicina de l'Esport*, 46(169), 23–27. <http://doi.org/10.1016/j.apunts.2010.11.002>
- Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M., Salgado, I., Olivares, S., ... Rodríguez, D. (2010). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41.
- Martinez, K., Souza, V., Bucio, L., Gómez, L., & Gutiérrez, M. (2013). Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta Toxicol.*, 21, 33–49.
- Microgen TM GnA + B-ID System. (2007). Retrieved from www.mediatec.com/chi/files/MICROGEN-GN-ID-MID64-641-65.pdf
- Nava, C., & Méndez, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencias*, 16(3), 141.
- Ñútez, D., Paredes, D., & Cubillos, J. (2014). Bioremediation for degradation of total hydrocarbons present in the sediments of a fuel service station. *Rev. Téc. Ing. Universidad Del Zulia*, 37(1), 21.

- Peréz, P., & Azcona, M. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 17(3), 200.
- Ramírez, A. (2002). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de La Facultad de Medicina*, 63(1), 52.
- Ramírez, J., Ulloa, P., Velázquez, M., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente, Año 2(7)*, 1.
Retrieved from
http://www.hablemosclaro.org/repositorio/biblioteca/b_305_bacterias_lacticas_importancia_en_alimentos.pdf
- Ramirez, L. (2012). *AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE BACTERIAS NO ENTÈRICAS CON CAPACIDAD DE ADAPTACIÓN EN ALTAS CONCENTRACIONES DE PLATA, PRESENTES EN UNA LAGUNA DE SEDIMENTOS DE LA PLANTA MINERA DEL SECTOR EL PACHE-PORTOVIEJO-EL ORO. UNIVERSIDAD POLITÈCNICA SALESIANA.*
- Remache, A. (2013). *Validación De Métodos Para El Análisis De Metales En Diferentes Matrices Por Espectrofotometría De Absorción Atómica.* Universidad Central del Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1859/1/T-UCE-0017-39.pdf>
- Riverón, E., Ramírez, N., Herrera, D., Barreras, G., Zayas, A., & Regueiro, A. (2012). Estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 43(2), 1.
- Rodríguez, R., Ramírez, N., Mogollón, L., & Zaucher, F. (1997). Precipitación enzimática del cadmio utilizando bacterias nativas del género *Citrobacter*. *Ciencia, Tecnología & Futuro*, 1.
- Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. (2009). Preparación de medios de cultivo. Retrieved from
http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practi

coI.pdf

- Sinha, S., & Kumar, S. (2009). PSEUDOMONAS AERUGINOSA KUCD1, A POSSIBLE CANDIDATE FOR CADMIUM BIOREMEDIATION. *Brazilian Journal of Microbiology*, (1517-8382), 655–662.
- Skoog, D., Holler, J., & Nieman, T. (2001). *Principios de análisis instrumental*. (McGrawHill, Ed.) (5ta ed.). Madrid.
- Soto, C., Gutiérrez, S., Rey-león, A., & González, E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *NOVA-PUBLICACIÓN CIENTÍFICA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS*, 195–205.
- Suárez, P., & Reyes, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia con el ambiente. *INTERCENCIA*, 27, 160.
- Tejada, C., Villabona, A., & Garcés, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico Adsorption of heavy metals in waste water using biological materials. *Tecno Lógicas*, 18(34), 111.
- Tirado, L., González, F., Martínez, L., Wilches, L., & Celedón, J. (2015). Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud Introducción. *Rev. Nac. Odontol.*, 85.
- Totora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Inducción a la microbiología*. Editorial Medica Panamericana. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA229&dq=inducccion+a+la+microbiologia&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwik6rma4cbNAhVDXR4KHeeHD-cQ6AEIHDAA#v=onepage&q=inducccion+a+la+microbiologia&f=false>
- Varela, G., & Grotiuz, G. (2002). *Fisiología y metabolismo bacteriano*. UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA DE URUGUAY. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf>
- Vargas, P., Cuéllar, R., & Dussán, J. (2004). Biorremediación de residuos del petróleo. *Apuntes Científicos Uniandinos*, (4), 45.

Vila, J., Urbizu, M., Grifoll, M., Bosh, M., Nilsson, J., López, S., & Piñuela, P. (2014).
Técnicas de biorremediación para el saneamiento del subsuelo. *Revista PQ*, 49.

Willey, J., Sherwood, L., & Woolverton, C. (2009). *Microbiología de Prescott, Harley y
Kleim*. MacGraw-Hill.

Anexos

Anexo 1. Material fotográfico

Materiales para la preparación de Agar Cetrimida



Figura 27. Indica los materiales y reactivos que se utilizaron en la preparación del medio de cultivo.
Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

Tinción Gram

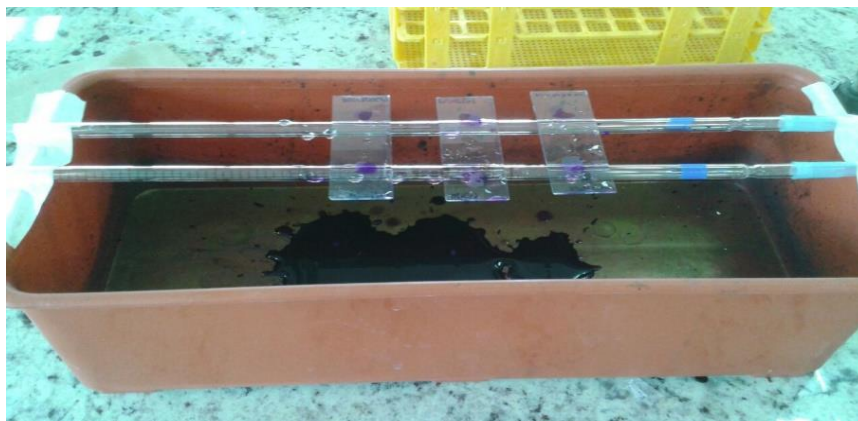


Figura 28. Tinción Gram de 3 colonias
Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

Anexo 2. Pruebas bioquímicas

Reactivos del kit Microgen GnA+ B-ID



Figura 29. Reactivos utilizados para realizar las pruebas bioquímicas del kit Microgen GnA+ B-ID
Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

Guía de resultados del kit Microgen GnA+ B-ID

Colour chart/Farbtafel/Tableau 'de couleurs
Microgen™ GN A ID

WELLSAPFCHEN / CODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7
Reaction	Lysine	Oxalithiaz	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Sybas	G.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Cheate	T.D.A.	Nitrate
Negative	Yellow	Green	Yellow	Blue	Blue	Blue	White	Yellow	Yellow	White	Yellow	Yellow	White
Positive	Green	Blue	Black	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Purple	Red	Blue	Red	Red

Microgen™ GN B ID

WELLSAPFCHEN / CODET	13													
Reaction														
Negative	White	Yellow	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Positive	Black	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow

* At 100°C. Run out of direct sunlight. Use to determine identification and assess results. The colours on this chart will change.
These colours are provided as general guide to the range of test colours.

Legend:

- Appropriate reagents to be added next to reaction.
- Chemical reagents removed out.
- ⊗ Not required method for routine routine reactions.

Figura 30. Lectura y revelado de la prueba bioquímica.
Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

Resultados de las pruebas bioquímicas



Figura 31. Resultados de las tiras GNA Y GNB después de 24 horas de incubación a 25 °C.
Elaborado por: C. Rubio y K. Terán

Anexo 3. Análisis del modelo lineal

Modelo lineal

```
##  
## Call:  
## lm(formula = y ~ x)  
##  
## Residuals:  
##   Min    1Q  Median    3Q   Max  
## -56.526 -41.362 -7.966  50.558  63.728  
##  
## Coefficients:  
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)  
## (Intercept) -5.055e+01  1.729e+01  -2.924  0.00993 **  
## x           6.372e-07  2.081e-08  30.618  1.24e-15 ***  
## ---  
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1  
##  
## Residual standard error: 45.67 on 16 degrees of freedom  
## Multiple R-squared:  0.9832, Adjusted R-squared:  0.9822  
## F-statistic: 937.5 on 1 and 16 DF, p-value: 1.244e-15
```

Figura 32. Análisis del modelo lineal

Fuente: C. Rubio y K. Terán

Anexo 4. Estadística aplicada para los datos de temperatura interna del cultivo a la concentración de 2 ppm.

Tabla 17.

Prueba de Shapiro-Wilk aplicada a los datos de temperatura interna del cultivo a la concentración de 2 ppm

	Cd Cd M2 01		Cd LPS 01 Cr 1		Cd M1 Cr1		CdM5 Pb2(2) A		Cd LPS 01 Pb 1(2)A	
	Incub adora	T° Ambiente	Incub adora	T° Ambiente	Incub adora	T° Ambiente	Incub adora	T° Ambiente	In cubad ora	T° Ambiente
W	0,99	0,89	0,83	0,79	0,80	1,01	0,84	0,77	0,78	0,93
c										
W	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98

Nota: C. Rubio y K. Terán

Tabla 18.

Prueba de U Mann-Whitney aplicada a datos los de temperatura interna del cultivo a la concentración de 2 ppm

	Cd Cd M2 01	Cd LPS 01 Cr 1	Cd M1 Cr1	CdM5 Pb2(2) A	Cd LPS 01 Pb 1(2)A
Z	-3,423	-4,089	-3,791	-4,503	-4,089
Za	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96

Nota: C. Rubio y K. Terán

Tabla 19.

Prueba T Student aplicada a los datos de temperatura interna del cultivo a la concentración de 2 ppm

	CdCdM201	CdM1Cr1
T	27,764	-37,018
A	1,7709	1,7709

Nota: C. Rubio y K. Terán

Anexo 5. Estadística aplicada a los datos de pH para la concentración de 2 ppm.

Tabla 20.

Prueba de Shapiro-Wilk para aplicada a datos de pH a una concentración de 2 ppm

	Cd Cd M2 01		Cd LPS 01 Cr 1		Cd M1 Cr1	
	Incubador a	T° Ambiente	Incubadora	T° Ambiente	Incubadora	T° Ambiente
Wc	0,90	0,69	0,50	0,83	0,34	0,34
W	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98

Nota: C. Rubio y K. Terán

Tabla 21.

Prueba de U Mann-Whitney aplicada a datos de pH a una concentración de 2 ppm

	Cd Cd M2 01	Cd LPS 01 Cr 1	Cd M1 Cr1
Z	-1,179	-2,849	0,276
Zα	1,96	1,96	1,96

Nota: C. Rubio y K. Terán