

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

DEPARTAMENTO ACADEMICO DE INGENIERIA AMBIENTAL



**BIOTRANSFORMACIÓN DE CADMIO POR MEDIO DE BACTERIAS DE
SUELO EN BIORREACTORES AIR LIFT**

Tesis

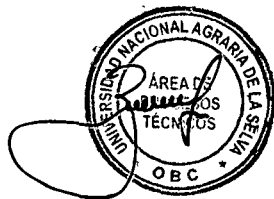
Para optar el título de:

INGENIERO AMBIENTAL

SABRINA SAMANTHA CORNEJO NARANJOS

Tingo María - Perú

2015



T
AMB

Cornejo Naranjos, Sabrina Samantha

Biotransformación de Cadmio por medio de bacterias de suelo en Biorreactores Air Lift.

85 páginas; 22 cuadros; 16 figuras; 70 ref.; 30 cm.

Tesis (Ingeniero Ambiental) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Recursos Naturales Renovables

1. BIOTRANSFORMACIÓN 2. BIOMASA MICROBIANA
3. BIOPELÍCULA 4. CADMIO 5. BIORREACTOR



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María – Perú



FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 20 de febrero del 2015, a horas 3:00 p.m. en la Sala de Grados de la facultad de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, para calificar la Tesis titulada:

“BIOTRANSFORMACIÓN DE CADMIO POR MEDIO DE BACTERIAS DE SUELO EN BIORREACTORES AIR LIFT”

Presentado por la Bachiller **SABRINA SAMANTHA CORNEJO NARANJOS**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobado con el calificativo de **“BUENO”**

En consecuencia, la sustentante queda apta para optar el Título de **INGENIERO AMBIENTAL**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del Título correspondiente.

Tingo María, 26 de febrero del 2015.

Dr. MANUEL NIQUE ALVAREZ
PRESIDENTE



Ing. JOSÉ LUIS PAREDES SALAZAR
VOCAL

Ing. VICTOR BETETA ALVARADO
VOCAL

Dr. CÉSAR S. LÓPEZ LÓPEZ
ASESOR

A mi madre **Maruja Naranjos
Flores,**

a mis hermanas **Grace V.
Montalván Naranjos y Wendy C.
Cornejo Naranjos,**

por su amor y consejos, hacen que
valga cada día

AGRADECIMIENTOS

Siempre resulta difícil agradecer a aquellas personas que han colaborado con un proceso, con un trabajo, porque nunca alcanza el tiempo, el papel o la memoria para mencionar o dar con justicia todos los créditos y méritos a quienes se lo merecen.

Partiendo de esta limitación y diciendo de antemano MUCHAS GRACIAS a todas las personas que de una u otra manera han colaborado en el desarrollo de esta tesis directa e indirectamente, deseo agradecer especialmente a:

- Mi familia por su constante apoyo y colaboración.
- A mi colegas y compañeros de estudio Luis Ramírez Tolentino e Iris Conteras Vergara por su amistad apoyo y participación incondicional durante el proceso de investigación
- Finalmente deseo decir un especial MUCHAS GRACIAS a mi Asesor de tesis el Dr. César Samuel López López, por su apoyo y confianza para realizar mi tesis en el laboratorio de microbiología, por su permanente contribución en cada etapa del trabajo, por su dedicación y aporte intelectual y por el ejemplo brindado ante cada uno de los requerimientos planteados.

INDICE

	Pág.
Resumen.....	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Planteamiento del problema.....	2
Hipótesis.....	2
Objetivos.....	2
Objetivo General.....	2
Objetivos específicos.....	3
II REVISION DE LITERATURA.....	4
Antecedentes generales.....	4
Cadmio.....	5
Fuentes de exposición al cadmio.....	6
Efecto tóxico del cadmio.....	9
Efecto del cadmio en ecosistema de agua dulce.....	12
Efecto del cadmio en el hombre.....	13
Biorremediación y biotransformación.....	14
Biorreactores tipo air lift.....	17
Factores que influyen en operación en biorreactores air lift.....	18
pH.....	19

Disponibilidad del oxígeno para actividad metabólica y crecimiento.....	19
Microorganismos.....	20
Biopelículas microbianas.....	21
Control de biomasa.....	23
Microorganismos y cadmio.....	23
III MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
Descripción de la zona de trabajo.....	26
Materiales y equipos.....	26
Unidad experimental.....	26
Muestreo del suelo.....	27
Ubicación del punto de recolección.....	27
Concentraciones de cadmio.....	27
Toma de muestra.....	27
Aislamiento de microorganismos.....	28
Etapas de adaptación-selección de bacterias en biopelículas.....	31
Preparación de los biorreactores Air lift.....	35
Operación de los biorreactores.....	36
Datos registrados.....	38
Determinación de oxígeno disuelto.....	38
Determinación de pH.....	39
Determinación de temperatura.....	39
Determinación de biomasa.....	39
Determinación del peso húmedo.....	40

Eficiencia de biotransformación.....	40
Determinación de la concentración final de cadmio.....	40
Rendimiento en biomasa.....	41
Identificación de microorganismos.....	41
Diseño experimental.....	42
Variables independientes y dependientes.....	43
Análisis estadístico.....	43
IV RESULTADOS.....	46
Identificación de microorganismos aislados.....	46
Determinación de los géneros de bacterias del suelo en biopelícula más eficiente para biotransformar el cadmio.....	48
Datos del biorreactor en operación.....	48
Determinación de oxígeno disuelto.....	52
Determinación de temperatura.....	54
Determinación de pH.....	54
Determinación de concentración final de cadmio.....	56
Determinación de biomasa microbiana.....	56
Determinación de biomasa por peso húmedo.....	58
Determinación del grado de eficiencia de biotransformación.....	59
Determinación del rendimiento en biomasa.....	60
Datos por biorreactor.....	62
Análisis estadístico.....	64
Análisis de varianza para eficiencia de biotransformación.....	64

Análisis de varianza para rendimiento en biomasa.....	66
V DISCUSIÓN.....	68
VI CONCLUSIONES.....	73
VII RECOMENDACIONES.....	74
VIII ABSTRACT.....	75
IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
X ANEXOS.....	85

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág
1. Coordenadas de los puntos de muestreo para extracción del suelo utilizado para la selección de microorganismos eficientes.....	28
2. Descripción de los tratamientos en estudio.....	43
3. Análisis de Varianza (ANOVA).....	44
4. Resultados de pruebas bioquímicas de identificación de las cepas aisladas.....	46
5. Bacterias desarrolladas en diferentes concentraciones de cadmio en la etapa de adaptación.....	48
6. Datos obtenidos de la primera repetición de cuatro (04) biorreactores operando con concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300.....	49
7. Datos obtenidos de la segunda repetición de cuatro (04) biorreactores operando con concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm...	50
8. Datos obtenidos de la tercera repetición de cuatro (04) biorreactores operando con concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm...	51
9. Datos obtenidos de la cuarta repetición de cuatro (04) biorreactores operando con concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm.....	52
10. Datos de OD de los diferentes biorreactores tomados durante el inicio, a los 3 días y al finalizar la operación.....	53
11. Datos de Temperatura en los diferentes biorreactores con los tratamientos de 60, 100, 200 y 300 ppm de cadmio tomados durante el inicio, a los 3 días y al finalizar la operación.....	54

12. Datos de pH en los diferentes biorreactores tomados durante el inicio, a los 3 días y al finalizar la operación.....	55
13. Concentraciones de cadmio determinadas al finalizar el tratamiento a 7 días de exposición en concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm.....	56
14. Datos de biomasa en los diferentes biorreactores con los tratamientos de 60, 100, 200 y 300 ppm de cadmio tomados durante el inicio, a los 3 días y al finalizar la operación.....	57
15. Datos del peso húmedo de biomasa en los diferentes biorreactores con los tratamientos de 60, 100, 200 y 300 ppm de cadmio (Cd) tomados durante el inicio, a los 3 días y al finalizar la operación.....	58
16. Datos del porcentaje de eficiencia al finalizar el tratamiento a 7 días de exposición en concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm.....	59
17. Datos del porcentaje de rendimiento al finalizar el tratamiento a 7 días de exposición en concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm.....	61
18. Resumen de datos obtenidos a los 7 días de operación en cada biorreactor.....	64
19. ANOVA. Eficiencia de Biotransformación de cadmio.....	65
20. Análisis de comparación por HSD de Tuckey para biotransformación...	65
21. ANOVA del rendimiento en biomasa.....	66
22. Análisis de comparación por HSD de Tuckey para rendimiento.....	67

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág
1. Ciclo biogeoquímico del cadmio.....	11
2. Transporte del cadmio en el suelo.....	12
3. Diagrama del proceso de aislamiento de microorganismos.....	30
4. Diagrama del proceso de adaptación-selección de microorganismos...	32
5. Esquema del biorreactor air lift.....	36
6. Esquema de la operación en el biorreactor.....	38
7. Diseño experimental.....	42
8. Línea de tendencia del oxígeno disuelto con respecto al tiempo de operación del biorreactor en los diferentes tratamientos (concentración de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm).....	53
9. Línea de tendencia del pH con respecto al tiempo de operación del biorreactor en los diferentes tratamientos (concentración de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm).....	55
10. Línea de tendencia de promedios de biomasa bacteriana con respecto al tiempo de operación del biorreactor en los diferentes tratamientos (concentración de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm).....	57
11. Línea de tendencia de los promedios en porcentaje de la eficiencia de biotransformación en los diferentes tratamientos, observando alta eficiencia de biotransformación para el tratamiento del biorreactor 3 y baja para biorreactor 1.....	60

12. Línea de tendencia del promedio del rendimiento en biomasa en porcentaje en los diferentes tratamientos, observando mayor rendimiento para el tratamiento del biorreactor 1 y bajo para biorreactor 4.....	61
13. Biorreactor 1.....	62
14. Biorreactor 2.....	62
15. Biorreactor 3.....	63
16. Biorreactor 4.....	63

RESUMEN

Se planteó biotransformar el cadmio (Cd) mediante la acción metabólica de bacterias de suelos desarrolladas en biopelículas en biorreactores air lift, relacionando el impacto ambiental que produce el cadmio en los suelos de Tingo María. Se diseñó una investigación poniendo en operación 4 biorreactores air lift en cultivo discontinuo (lote o batch) a diferentes concentraciones de Cd (60, 100, 200 y 300 mg/L) con 120 ml de inóculo de siembra y 680 ml de medio mínimo de sales como nutriente por un tiempo de operación de 7 días. Se extrajo muestras de suelos de plantaciones de cacao y se llevaron al laboratorio para seleccionar los microorganismos existentes, se adaptó a bajas concentraciones de Cd (0.6, 1, 2 y 3 mg/L) eligiendo los microorganismos desarrollados en la más alta concentración. Se determinó temperatura, pH, Oxígeno Disuelto, biomasa; la concentración final de cadmio a una λ de 228,8 nm, la eficiencia de biotransformación y el rendimiento de biomasa al inicio, a los 3 días y al finalizar la operación del biorreactor. Las determinaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de suelos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva. Los resultados indicaron que la biomasa en biopelícula aumentó en las concentraciones menores (60 y 100 ppm de Cd), se evidenció elevación del pH, existiendo una disminución progresiva del oxígeno disuelto, del nutriente y el sustrato (Cd), mostrándose el mayor porcentaje de eficiencia de biotransformación (78.58 %) en el biorreactor 3 con 200 mg/L de Cd y un rendimiento de biomasa mayor en el biorreactor 1 (68.23%) cuyo tratamiento fue de 60 mg/L de cadmio. Se concluye que al existir un aumento en el pH (alcalinización) y en la concentración de cadmio los microorganismos inician la biotransformación siendo utilizado el cadmio como fuente de energía por los microorganismos.

Palabras claves: Biotransformación, cadmio, biorreactor, biopelícula, biomasa microbiana.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental ocasionado por el cadmio; elemento poco abundante en la corteza terrestre que generalmente se encuentra en las industrias como inevitable subproducto de la extracción de zinc, plomo y cobre y encontrado también en estiércoles y pesticidas, es una de las preocupaciones más latentes en estos tiempos ya que su peligrosidad radica en su característica de no ser degradado en el entorno y de ser acumulativo incrementando el deterioro ambiental, causando serios problemas a todos los organismos vivos.

Uno de los peligros ambientales en la zona de Tingo María se presenta en suelos con plantaciones de cacao en los que las concentraciones de cadmio son introducidos por la fertilización siendo peligroso la transferencia de este metal desde el suelo a las plantas y de esta manera entra a la cadena trófica; por tal motivo utilizamos en este estudio microorganismos adaptados a estos suelos para la realización de la biotransformación del cadmio.

Los microorganismos del suelo tiene la capacidad para inmovilizar este metal pesado (CHANMUGATHAS y BOLLAG, 1987). Los microorganismos han desarrollado estrategias variadas y eficientes para resistir

la toxicidad de los metales nocivos (CERVANTES *et al.*, 2006). Una de las estrategias para la supervivencia microbiana en entornos hostiles, es cuando las células, para tolerar la presencia de metales los transforman en formas menos tóxicas, no se pretende decir que esta transformación sea de un metal a otro, los microorganismos aprovechan que algunos metales existen como iones con carga positiva o forma metálica carente de carga, la cual es menos reactiva y tóxica, algunas veces inocua (CERVANTES *et al.*, 2006).

El uso de la biorremediación se considera una técnica potencialmente capaz de dar soluciones para la transformación de metales pesados con un gasto financiero y tecnológico relativamente menor.

En la presente investigación se planteó la interrogante ¿Las bacterias del suelo pueden biotransformar el cadmio en biorreactores air lift?, estimándose en los resultados que las bacterias de suelos con plantaciones de cacao biotransforman el cadmio con un rendimiento mayor al 68%.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Determinar la biotransformación de cadmio por medio de bacterias del suelo en biorreactores air lift..

1.1.2. Objetivos específicos

- Aislar géneros de bacterias a partir de suelos con plantaciones de cacao que sean eficientes para biotransformar el cadmio.
- Calcular los parámetros (OD, pH, T°) de los efluentes de los biorreactores air lift.
- Determinar la biomasa de bacterias del suelo desarrollada en biopelícula que biotransforman el cadmio.
- Determinar la eficiencia de biotransformación de cadmio en biorreactores air lift por medio de bacterias del suelo.
- Indicar el rendimiento del desarrollo bacteriano en biopelícula en la biotransformación del cadmio.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

El cadmio se descubrió en 1817, en minerales de zinc. Históricamente todos los episodios ambientales importantes causados por el cadmio han sido resultado de la contaminación proveniente de la minería y refinado de materiales no ferrosos. El problema ambiental más serio que ha sido reportado hasta la fecha ocurrió en el valle del río Jintsu, en Japón, en donde el arroz de consumo local se regaba con agua del río y este estaba contaminado con cadmio disuelto que procedía de una mina de zinc y plomo situada río arriba. Cientos de personas de esta área, particularmente mujeres de edad avanzada y multíparas presentaron una enfermedad degenerativa de los huesos a la que se llamó "itai-itai" (SALDIVAR *et al.*, 1997).

En las personas afectadas, algunos iones Ca^{2+} de los huesos fueron remplazados por iones Cd^{2+} , pues ambos iones tienen el mismo estado de oxidación y casi el mismo tamaño, ocasionando osteoporosis y malformaciones en los huesos.

2.2 Cadmio

El cadmio existe como mineral en forma de sulfuro de cadmio y se encuentra casi siempre asociado a la presencia de zinc (RODRÍGUEZ, 2001). También se presenta como sustituto del calcio en la apatita y en la calcita, pudiendo aumentar sus impurezas en los fertilizantes fosfatos (DAS *et al.*, 1998).

Las características más remarcables del cadmio son su gran resistencia a la corrosión, su punto bajo de ebullición y su excelente conductividad eléctrica. Los compuestos de cadmio presentan una gran resistencia a la acción de los compuestos químicos y a las altas temperaturas (GARCIA, 2002).

El cadmio forma numerosos complejos con iones como haluros, nitratos, sulfatos, tiosulfato, amonio y cianuro, generalmente no demasiado estables. Además, una gran variedad de sales y sales básicas de este metal son moderadamente o incluso bastante solubles en agua. El comportamiento fisicoquímico del cadmio en el agua depende de su compleja especiación química, regida por el pH del medio y por la dureza del agua (es decir su contenido en bicarbonatos, calcio y magnesio) así como por la presencia de ligando orgánicos e inorgánicos y de metales fácilmente intercambiables por el cadmio. De este modo la solubilidad de este elemento en el medio está en función al valor de pH, a medida que el medio es más ácido la solubilidad incrementa (MARIN, 2003).

Es un metal que no se encuentra fácilmente en la naturaleza como metal, pero si en combinaciones minerales con otros elementos como oxígeno (óxido de cadmio), cloruro (cloruro de cadmio), sulfuro (sulfato de cadmio). Estos son solubles en agua. (BRUBAKER, *et al.*, 2002).

2.3 Fuentes de exposición de Cadmio

2.3.1. Natural

La actividad volcánica es la mayor fuente natural de liberación de cadmio a la atmósfera. Se ha calculado que el incremento total anual debido a esta fuente es de entre 100 y 500 toneladas. El vulcanismo subterráneo también libera cadmio al ambiente, pero aún no se ha cuantificado el efecto de este proceso (SALDIVAR *et al.*, 1997).

Naturalmente el cadmio existe en el suelo en promedios de <1 ppm, asociado al Zinc, la principal especie de cadmio en la solución del suelo es Cd^{2+} aunque también puede formar los siguientes iones complejos: CdCl^+ , CdOH^+ , CdHCO_3^+ , CdCl_3^- , CdCl_4^{2-} , $\text{Cd}(\text{OH})_3^-$ y $\text{Cd}(\text{OH})_4^{2-}$ junto con complejos. En suelos contaminados las especies de cadmio soluble predominante es el ión libre Cd^{2+} junto con otras especies neutras como CdSO_4 o CdCl_2 , presentes en cantidades crecientes donde el pH es mayor que 6.5. El cadmio no tiene función biológica esencial y tanto él como sus compuestos son muy tóxicos para plantas y animales (ALLOWAY, 1995).

La presencia de cadmio en la atmósfera es consecuencia de la polución natural, producida por la capacidad de las plantas de concentrar el cadmio de origen geoquímico y tras su descomposición dispersarlo en el medio ambiente (PISCATOR, 1985).

2.3.2. Antrópica

Se produce contaminación a partir de las manipulaciones de extracción y refinado del metal, así como de sus múltiples usos industriales. La gran variedad de fuentes de emisión, por otra parte, da lugar a sensibles diferencias del contenido en cadmio de la atmósfera de las áreas urbanas e industriales con respecto a áreas rurales. También ha existido una gran preocupación acerca de la lluvia ácida y de su capacidad para aumentar la biodisponibilidad de cadmio en el suelo y por tanto, en los productos agrícolas (PISCATOR, 1985).

La utilización industrial del cadmio es también el origen de su presencia en los alimentos, particularmente en los de origen vegetal, lo que a su vez repercute en los animales, que consumen productos vegetales para su alimentación. Los fertilizantes y plaguicidas, las aguas residuales utilizadas para el riego, así como la deposición atmosférica, hacen del cadmio un elemento común en los suelos de cultivo, de donde es fácilmente absorbido por las plantas.

En los alimentos industrializados también se han citado como posibles fuentes de contaminación las operaciones de elaboración y los materiales de envasado (ANDERSON *et al.*, 1992; SHIMABOTO Y BJELDANES, 1993; ZURERA-COSANO, 1993).

Se originan a partir de las minas metalúrgicas, ya que el cadmio se extrae como subproducto del Pb, Zn, Cu y otros metales, las incineradoras municipales, y emisiones industriales procedentes de la producción de pigmentos para cristales, anticorrosivos, baterías de Ni/Cd, e insecticidas (MCLAUGHLIN y SINGH, 1999).

El uso de fertilizantes fosfatados es la principal fuente de contaminación de Cd en suelos agrícolas. Otra fuente de Cd la constituyen los fangos procedentes de aguas residuales que se utilizan en agricultura (ALLOWAY y STEINNES, 1999).

Contaminación accidental ocurre eventualmente debido a la contaminación de tierras por procesos industriales, residuos de la minería y corrosión de estructuras galvanizadas. Un ejemplo son los vertidos de Aznalcóllar que tuvieron lugar en 1998, en la provincia de Sevilla, como consecuencia de la rotura de una balsa que contenía concentraciones elevadas de metales pesados procedentes de una mina de esta localidad (AGUILAR *et al.*, 2003).

2.4 Efecto tóxico del cadmio

2.4.1. Efecto del cadmio en el ecosistema terrestre

Debido a que se utilizaron bacterias de suelos de plantaciones de cacao se menciona lo siguiente: en un estudio realizado en las regiones de Huánuco y Ucayali se determinó el contenido promedio de cadmio disponible en el suelo y fue de 0.53 ppm (HUAMANI et al., 2012). La unión europea establece que en los suelos agrícolas las máximas concentraciones totales permitidas de metales pesados es 3 ppm en el caso del cadmio (ACEVEDO et al., 2005). La evaluación del contenido de cadmio en semillas de cacao en parcelas de estas regiones se reveló la presencia de cadmio en niveles superiores al permitido (0.5 ppm) (CARDENAS, 2012).

El cadmio está normalmente presente en el suelo a concentraciones menores a 1 ppm. Generalmente entre 0.15 y 0.2 ppm. Un estudio en USA por Klein (KLEIN, 1972). Revela que de 250 muestras de suelos, 70 suelos de áreas residenciales presentaron una concentración promedio de 0.41 ppm., 91 muestras de áreas agrícolas 0.57ppm y 86 muestras de áreas industriales 0.66 ppm en Japón y las áreas con sospecha de contaminación revelaron niveles entre 1 y 69 ppm (KLEIN, 1972).

Químicamente, el cadmio se puede encontrar disuelto en el agua contenida en el suelo, adsorbido en superficies orgánicas e inorgánicas, formando parte de minerales, precipitado con otros compuestos del suelo o incorporado a estructuras biológicas. Sin embargo la biodisponibilidad del

cadmio para la planta depende de numerosos factores físicos, químicos y biológicos que modifican su solubilidad y el estado del metal en el suelo. Uno de los principales factores es el pH del suelo, el potencial redox, la temperatura y el contenido en arcillas, materia orgánica, y agua (CHRISTENSEN y HAUNG 1999). Por último es importante destacar el tipo de cultivo del que se trate, ya que no todas las plantas acumulan cadmio en igual medida (PRINCE *et al.*, 2002).

Las principales variaciones en el contenido de cadmio en el suelo se deben a la composición de las rocas y al suministro de metales que provienen de fertilizantes, abonos, agroquímicos y a la contaminación atmosférica. Los lodos de las aguas negras y los superfosfatos que se utilizan en la agricultura pueden también contaminar el suelo con cadmio ya que los suelos tratados con ellos pueden llegar a contener hasta 100 mg de cadmio/kg de peso seco (BADILLO, 1989).

Las plantas no tiene mecanismo para excretar cadmio por lo que lo absorben y retienen en sus tejidos acumulándose generalmente en mayor cantidad en las raíces y en menor cantidad en las frutas (ROHLEDER y KORTE, 1982).

Los niveles de cadmio observados en animales dependen de la especie, tejido, alimentación y otros factores. Estudios realizados en cerdos y otros animales domésticos ha mostrado que las más altas concentraciones de cadmio (cerca de un rango de 2 a 5 mg/kg de peso seco) ocurren en el riñón y

en el hígado encontrado en menor concentración en el músculo y otros tejidos (ROHLEDER y KORTE, 1982).

Debido a que el cadmio es un metal relativamente volátil es inevitable su liberación en altas concentraciones a las atmósfera durante los procesos de soldadura. El valor promedio de este de este metal en el aire es aprox. de 0.002 mg/m^3 .

Debido a los procesos físicos como el viento, erosión y procesos biológicos, el cadmio se trasfiere de un lugar a otro y se ve afectado más aún por la mano del hombre alterando el ciclo biogeoquímico del cadmio (figura N° 1 Y 2) (ROHLEDER y KORTE, 1982).

CADMIO EN EL AMBIENTE

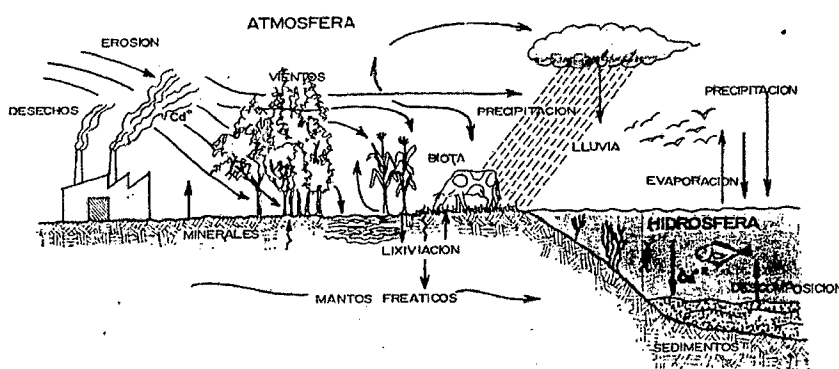


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del cadmio.
(ROHLEDER y KORTE, 1982).

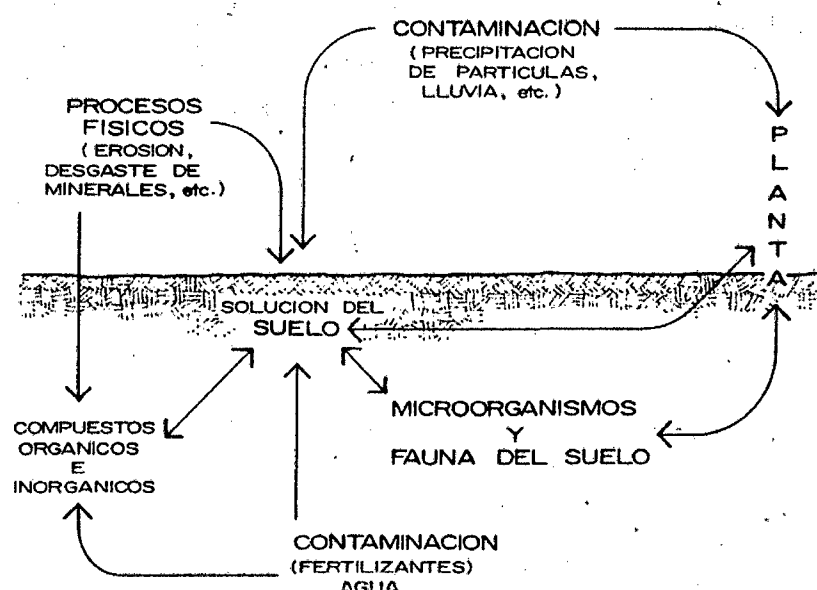


Figura 2. Transporte de cadmio en el suelo.
(ROHLEDER y KORTE, 1982).

2.4.2. Efecto del cadmio en el ecosistema de agua dulce

Una porción sustancial de cadmio en el agua de río es absorbida por las partículas de suspensión, sin embargo, el cadmio iónico predomina bajo condiciones acuosas aeróbicas, especialmente en agua blanda de relativamente bajo pH.

Solo las formas solubles de cadmio que se conocen son tóxicas al pez. Una disminución de la dureza del agua y de la concentración de oxígeno disuelto y posiblemente del pH pueden resultar en un CL_{50} bajo. La temperatura y salinidad pueden también afectar la toxicidad del cadmio. En peces, la entrada de cadmio ocurre de dos maneras, por la ingestión de alimentos o por su entrada a través de las branquias. El metal es acumulado

predominantemente por las branquias, hígado y riñón, pero poco se conoce acerca de su significancia toxicológica. La acumulación puede ocurrir en un periodo corto y puede causar la muerte algunos días después. La acumulación en el músculo (peso seco) expuestos a periodos largos y de bajas concentraciones de cadmio en agua es altamente variable y puede ser mal alta que en el agua (ROHLEDER, 1982).

2.4.3. Efecto del cadmio en el hombre

Según un estudio de NOGAWA *et al.*, (1989) la dosis mínima de cadmio capaz de inducir efectos adversos para la salud humana sería de 2 mg. Esta cantidad varía mucho dependiendo de la fuente de intoxicación. Por ejemplo, la ingesta diaria de 140 –260 µg de cadmio para un adulto de 70 Kg comenzaría a producir alteraciones renales tras 50 años de exposición al metal, mientras que la exposición diaria a 50 µg/m³ de Cd²⁺ en ambientes laborales produciría estas alteraciones después de 10 años de exposición (WHO, 1979; FRIBERG y PISCATOR, 1974).

La principal fuente de contaminación de cadmio en el ser humano es la ingesta de vegetales contaminados con este metal (NORVELL *et al.*, 2000).

2.5 Biorremediación y Biotransformación

2.5.1. Biorremediación

Es una tecnología basada en la utilización de los microorganismos y su potencial degradador para eliminar los contaminantes del medio, mediante su transformación en productos inocuos como el CO₂ y el H₂O (SOLANAS, 2009).

El ambiente más favorable para la mayor parte de los microorganismos (bacterias, hongos y algas) (MCCULLOUGH *et. al* 1999) son:

- Temperatura: 15-45°C.
- pH: entre 5,5 y 8,5.
- Relación de nutrientes carbono: nitrógeno: fosforo de 120:10:1.
- Presencia de agentes oxidantes y/o reductores que permitan las reacciones metabólicas de los microorganismos.

Es una tecnología que aprovecha el potencial de los microorganismos que persisten en ambientes desfavorables, para remover, extraer, degradar o transformar compuestos orgánicos e inorgánicos; es así, como se movilizan los metales pesados, pasándolos de un estado inicial insoluble a un estado final soluble, proceso conocido como lixiviación microbiana, o se inmovilizan pasándolos de un estado soluble inicial a uno insoluble final en fase sólida, estas transformaciones dependen del estado de oxidación y de la especie del metal que esté conformando (Vullo, 2003, Adeniji, 2004, Madigan *et al.*, 2004).

2.5.2. Biotransformación

El principal problema de los metales pesados en el ambiente es que no pueden ser biodegradados; sin embargo los microorganismos pueden interaccionar con ellos transformándolos los cuales obedecen a cambios en el estado de oxidación; esto influye de forma drástica en la movilidad del contaminante, ya que en algunos casos aumenta la solubilidad de los productos de alteración, favoreciendo así su eliminación del medio, y en otros casos disminuye produciéndose una inmovilización del contaminante. La elección entre una u otra transformación dependerá de si se pretende eliminar la contaminación o si se quiere evitar su llegada a zonas específicas (MCCULLOUGH *et. al* 1999).

Las reacciones responsables de los procesos de biotransformación están relacionadas con el metabolismo de los microorganismos existentes. Para que dichos microorganismos puedan crecer y desarrollar sus funciones vitales necesitan un aporte de nutrientes, básicamente carbono, nitrógeno y fosforo; así como donantes y aceptores de electrones (VAN CAUWENBERGHE y ROOTE, 1998). Estos últimos son imprescindibles como fuente de energía, ya que la transferencia catalizada de electrones entre donantes y receptores libera la energía requerida para que se produzcan las reacciones bioquímicas vitales. Algunos metales pesados pueden actuar como donantes y aceptores de electrones, o como fuente de energía, y por ello es posible su

biotransformación. Los organismos que utilizan metales como fuentes principales de energía son los denominados chemolitoautotrofos.

Las principales transformaciones de los metales pueden ser directas, por medio de cambios en el estado de valencia cuando actúan como donantes o receptores de electrones e indirectas, por medio de agentes oxidantes y reductores producidos por los microorganismos y que son responsables de cambios en el pH y del potencial redox (MCCULLOUGH *et al.*, 1999; NÁPOLES y ÁBALOS, 2011).

Se pueden encontrar microorganismos resistentes y/o tolerantes a los metales pesados; en el caso de los tolerantes indiferentes a su presencia o ausencia, facultad que puede ser mediada por plásmidos, en tanto, los microorganismos resistentes poseen mecanismos de detoxificación inducidos por el metal. La tolerancia y resistencia se deben a fenómenos de biosorción, bioacumulación, biotransformación, biomineralización y quimiosorción (Clausen, 2000, Vullo, 2003, Madigan *et al.*, 2004).

En la biotransformación, se produce en el metal un cambio químico en el estado de oxidación o metilación, que es mediado por enzimas microbianas, lo que da como resultado compuestos poco solubles o compuestos volátiles; estas enzimas *in vitro*, pueden tener su actividad máxima bajo condiciones diferentes a las óptimas de crecimiento del microorganismo (Park *et al.*, 2000, Vullo, 2003).

2.6 Biorreactores tipo air lift

Un sistema de tratamiento biológico tipo air lift, consiste básicamente en una columna en cuyo interior se encuentra una fase líquida móvil que contiene al cultivo en suspensión y una fase continua de reacción de gas líquido (AGUAYO, 2005).

Los biorreactores tipo air lift ofrecen ciertas ventajas con respecto a las demás tecnologías de tratamiento biológico, como la incorporación de transferencia y biodegradación total en un solo recipiente del biorreactor y además no presenta problemas de humedad, siendo el control de biomasa su única limitación (EDWARDS, *et al.*, 2002).

Los biorreactores tipo air lift están constituidos por una cámara de cultivo cilíndrica de vidrio, tubo deflector o de distribución central y frascos con solución saturada de NaCl como filtros para aire, la fuente de aeración fue una bomba de aire de pecera (AIR PUMP JUNIOR) que proporciona 1,100 mL/min O₂ (LÓPEZ, 1998; MIRANDA *et al.*, 2006).

Antes de poner en marcha la operación de un biorreactor es importante la esterilización al vapor de agua, utilizando el autoclave a 121°C a 15 lbs/pulg² por 15 minutos; y por sumersión en solución alcohol-ácida al 1 % (etanol-HCl) los accesorios del biorreactor como son la cubierta superior

(material micro poroso) válvulas de control de entrada/salida de aire y conectores de flujo de aire (LÓPEZ, 1998; MIRANDA *et al.*, 2006).

2.6.1. Factores que influyen en la operación del biorreactor air lift

2.6.1.1. Temperatura

La mayoría de los microorganismos que se utilizan son mesófilos, es decir, pueden desarrollarse o realizar sus funciones metabólicas a temperaturas que oscilan entre los 10 y 35 °C. (VERGARA *et al.*, 2002).

Cuando los microorganismos utilizados corresponden a más de una especie, las variaciones de temperatura no afectan en forma tan drástica en la eficiencia de eliminación del sistema debido a que frente a leves cambios, este parámetro se restaura rápidamente pues se logran condiciones ambientales más favorables para especies que antes estaban inactivas. Este fenómeno, sin embargo, presenta algunas limitaciones.

Las altas temperaturas pueden provocar que algunas reacciones metabólicas de los microorganismos ocurran muy rápidamente, provocando una descoordinación en su metabolismo y disminuyendo entonces la eficiencia de eliminación del biorreactor (QUIROZ, 2003).

2.6.1.2. pH

Normalmente, durante la operación del sistema, el pH empieza a decrecer debido a la formación de ácidos intermedios que reaccionan con algunos de los componentes del medio, lo que puede disminuir e incluso detener la actividad microbiana en el interior del biorreactor. Para remediar esta situación, periódicamente debe agregarse al biorreactor una solución alcalina que permita equilibrar el pH de este; El pH de los medios se ajusta a 7 debido a que las bacterias de los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* son neutrófilas y que su pH óptimo de crecimiento es 7. La mayoría de las bacterias crecen a este pH debido a que es equivalente al pH interno de las células, que se mantiene por medio de un intercambio de iones entre el medio y la célula con el fin de mantener un equilibrio osmótico (MADIGAN *et al.*, 1999).

Se encontró que el pH del medio se alcalinizó progresivamente después de 96 horas de crecimiento microbiano, el aumento en el pH es probable que sea vinculado con la transformación de Cd a una especie insoluble dentro de la célula o alrededor (SINHA y KUMAR, 2009).

2.6.1.3. Disponibilidad de oxígeno (OD) para la actividad metabólica y el crecimiento

El oxígeno constituye un aceptor de electrones que debe inyectarse al medio líquido de manera que la población contenida en este último pueda activar su metabolismo y sobrevivir (BALLERINI *et al.*, 1998). Dado que el oxígeno es el sustrato limitante de la velocidad de crecimiento, cuando el

cultivo se encuentra en crecimiento, el flujo de entrada oxígeno (F_{iO_2}) será mayor al flujo de salida de oxígeno (F_{fO_2}) debido al consumo de oxígeno disuelto en el líquido por parte de las células o microorganismos en crecimiento y/o división celular. (SCRAAG, 2002).

2.6.1.4. Microorganismos

Los microorganismos desarrollados en la biopelícula son el componente más crítico del sistema Air lift, ya que son ellos los que producen la transformación o destrucción del contaminante. La población microbiana requiere un cuidadoso control de su ambiente, tomando en cuenta factores como temperatura, pH y nutrientes.

Los organismos que se utilizan para inocular los biorreactores son muy variados. Dentro de ellos, los más comunes son las bacterias, hongos y algunas algas. Su selección dependerá principalmente, de la naturaleza del contaminante y de las características biológicas del microorganismo, vale decir, de las condiciones ambientales a las cuales este se desarrolla (RATHOR *et al.*, 2003). Eligiendo las condiciones de operación correctas, muchos microorganismos pueden adherirse a una superficie sólida, que puede ser utilizada como sustrato o solamente como soporte, formando una biopelícula que se compone de una compleja estructura de células y productos celulares como polímeros extracelulares (OLIVE *et al.*, 2002). Cuando la biopelícula está compuesta de diferentes microorganismos, donde cada uno tiene sus propias necesidades y parámetros cinéticos los microorganismos tienden a competir por el espacio y por el sustrato, esto es, donde exista la menor limitación y la

mayor concentración de sustrato, respectivamente (BLENKLE y SMERT, 2002).

2.6.1.5. Biopelículas microbianas

Es la agregación y encapsulación de los microorganismos por medio de una sustancia polimérica extracelular (SPE) en una estructura compleja de microhabitats en distribución espacial de diferentes microorganismos con metabolismos sinérgicos y tasas de crecimiento lentas, lo cual permite que en su interior se produzcan y mantengan condiciones químicas favorables al crecimiento de poblaciones específicas (STEWART, 2003 y MARTÍNEZ *et al.*, 2006).

La biopelícula tiene un gran impacto en la resistencia al estrés, en el intercambio metabólico y genético y en la plasticidad fenotípica, y hace de ella, una buena candidata para el desarrollo de procesos de biorremediación, como para la búsqueda de bacterias resistentes y/o tolerantes a contaminantes. Además, la formación de biopelícula hace parte del ciclo de vida natural de las bacterias y juega un rol preponderante en los ciclos biogeoquímicos de los metales, en donde estas son las más eficientes recicladoras del ambiente (STEWART, 2003, HARRISON *et al.*, 2005 y MARTÍNEZ *et al.*, 2006).

Las biopelículas son comunes en ambientes contaminados con metales, en donde, el comportamiento de estos es controlado por un orden

complejo y cambiante de procesos que incluyen transformaciones redox, precipitación/disolución y reacciones de adsorción/desadsorción, todo íntimamente ligado al estado geoquímico del sistema y selectivamente influenciado por la actividad microbiana. Una de las ventajas mas interesantes, es la transferencia horizontal de material genético que puede ocurrir a tasas elevadas y por fenómenos de conjugación (MARTÍNEZ *et al.*, 2006).

El fenómeno de tolerancia de la biopelícula se presume que esta mediado por el desarrollo de las subpoblaciones microbianas persistentes, asociadas con fenotipos de crecimiento lento y que estas "persistentes" no son mutantes, sino células sobrevivientes especializadas producidas por una población genéticamente homogénea. Así, la persistencia puede ser parte de un mecanismo altamente conservado y generalizado de tolerancia microbiana a la amenaza ambiental (STEWART, 2003, HARRISON *et al.*, 2005 y MARTÍNEZ *et al.*, 2006).

En los últimos años, la biopelícula se ha constituido como una fuente inagotable de microorganismos: hongos, algas, protozoos y bacterias con potencial biorremediador, los cuales son aislados en el laboratorio y experimentalmente ensayados algunas veces bajo las condiciones fisicoquímicas y/o biológicas del sitio del cual han sido extraídos (PARK *et al.*, 2000; HARRISON *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2006; MARTÍNEZ *et al.*, 2006; CHENG, y LI, 2009; VERMA *et al.*, 2009).

2.6.1.6. Control de biomasa

Existe una relación directa entre este parámetro y la eficiencia de eliminación del contaminante, por lo tanto el control de la biomasa posibilita el aumento de la flexibilidad operacional del sistema. Lo anterior se fundamenta, debido a que el desarrollo de la biopelícula en suspensión y distribución uniforme en el interior del reactor, es una tarea importante para la operación estable y confiada de un biorreactor Air lift.

Asimismo el control de esta variable es un factor muy importante ya que condiciona la transferencia del contaminante entre las fases (QUIROZ, 2003). El aumento equilibrado de biomasa, significa la existencia de una mayor cantidad de microorganismos activos presentes en el reactor, ya que estos requieren una mayor cantidad de oxígeno para realizar su actividad metabólica y reproducción (RATHOR y ALVAREZ, 2003).

2.7 Microorganismos y cadmio

La capacidad de adsorción máxima (q_{max}), indica la relación entre la cantidad de metal capturado por unidad de sorbente; La q_{max} de cadmio en bacterias como: *Bacillus brevis* es de 13.7 mg/g, *Ps fluorescens* es 6.5 mg/g, *Bacillus cereus* es 5.3 mg/g, *Bacillus brevis* es 10.5 mg/g. Hongos filamentosos como: *Penicillium* es 22.7 mg/g, *Trichoderma sp* es 16.7 mg/g, *Pillacinus* es 20.3 mg/g, *Fusarium sp* 24.8 mg/g (GARZA, 2005). El alga *Chlorella*

pyrenoidosa cepa G mostró altos valores de q_{max} de cadmio (II) (65.9 mg.g⁻¹); elemento metálico de gran impacto ambiental (VOLESKY, 1999).

Se han detectado bacterias del género *Pseudomonas* de ambientes mineros que presenta resistencia a metales pesados como Cd, Cu y Pb (RIVAS *et al.*, 2004). Algunas especies de microalgas marinas para biosorción de cadmio (BASSO *et al.*, 2002). Se ha determinado la bioadsorción de cadmio con biomasa celular a partir de quince hongos (ACOSTA *et al.*, 2007), Se sabe que *Escherichia coli* es capaz de bioacumular cadmio en concentraciones de 5 mg/L (LASAT, 2002).

En estudios de suelos contaminados tanto con metales pesados como con contaminantes orgánicos, utilizando los géneros *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp* y *Arthrobacter sp*, se ha encontrado que resisten distintas concentraciones de cadmio.

Algunas especies de *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp*, presentan un mecanismo de acumulación intracelular del metal, con una resistencia de hasta 225 y 275 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Mientras que otras especies de *Pseudomonas sp* y *Arthrobacter sp*, resisten una concentración de 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$ del metal, respectivamente, por medio de un mecanismo extracelular, formando una pared polimérica extracelular a la cual se une el metal (MIJARES *et al.*, 2003; VULLO *et al.*, 2003).

Las cepas bacterianas de los géneros *Massilia sp.*, *Pseudomonas sp.*, y *Bacillus sp.* son las más prometedoras para mejorar la eficiencia de biorremediación de suelos contaminados con cadmio (HRYNKIEWICZ, *et al.*, 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción de la zona de trabajo

3.1.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología General de la Universidad Nacional Agraria de la Selva ubicada en el campus universitario Km 1.5 entre las coordenadas UTM 390631,8971184 y 390642,8971164, distrito de Rupa Rupa provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, durante los meses de Marzo – Agosto 2014.

3.2. Materiales y equipos

Para la ejecución del presente trabajo de investigación se utilizó diferentes equipos, entre ellos oxímetro (HANNA) modelo HI 9146, pH metro (EXTECH) modelo 47227, termómetros digitales (ROAST) modelo JR -5 y una balanza analítica marca AND modelo GR-200, debidamente calibrados.

3.3. Unidad experimental

Bacterias del suelo que biotransforman el cadmio (Cd)

3.4. Muestreo de suelo.

3.4.1. Ubicación del punto de recolección.

La muestra de suelo se recolectó de una plantación de cacao, ubicado a 8 km., de la ciudad de Tingo María (camino a Catarata Santa Carmen) coordenada UTM 8965235,393858, fundo del Sr Eugenio. Se seleccionaron completamente al azar los puntos de muestreo de suelo. Se colectaron 5 muestras de suelo para determinar las poblaciones de bacterias.

3.4.2. Concentraciones de Cadmio

- Etapa de Adaptación

Las concentraciones de cadmio utilizadas para la etapa de adaptación – selección de bacterias biotransformadoras de cadmio (Cd) son 0.6 ppm, 1 ppm, 2 ppm y 3 ppm, atendiendo a lo resaltado en la literatura consultada (SCRAGG, 2002).

- Etapa de Biotransformación

Las concentraciones de cadmio en la etapa de biotransformación fueron de 60 ppm, 100 ppm, 200 ppm y 300 ppm (SCRAGG, 2002).

3.4.3. Toma de muestra.

Se seleccionó completamente al azar los puntos de muestreo de suelo, estos fueron cinco (5) puntos que unidos forman un polígono de cinco lado, se recolectó de cada punto 1 kg de muestra (las muestras tomadas son al pie de árboles de cacao de una altura de 1.5 metros aproximadamente), se

mezcló dichas muestras para uniformizarlas, se secaron y tamizaron en el laboratorio de suelos, luego se pesó solo 100 g de suelo y esta fue trasladada al laboratorio de microbiología para su utilización (COYNE, 2000).

Cuadro 1. Coordenadas de los puntos de muestreo para extracción del suelo utilizado para la selección de microorganismos.

Muestras	Coordenadas UTM	Altitud (msnm)
1	8965235,393858	766
2	8965236,393879	763
3	8965225,393897	760
4	8965204,393903	753
5	8965214,393852	764

Fuente: Elaboración propia

3.5. Aislamiento de microorganismos

De la muestra recolectada se pesó 10 g que posteriormente se agregó a un matraz con 90 mL de caldo peptona-manitol, se mezcla moviendo el matraz en forma circular y con un papel filtro N° 4 se filtra la mezcla, utilizando una pipeta graduada se extrae 10 mL del filtrado y se le agrega a un matraz con 90 mL de BHI. Se dejó en incubación por 48 horas a una temperatura de 37 °C. (BRADSHOW, 2000).

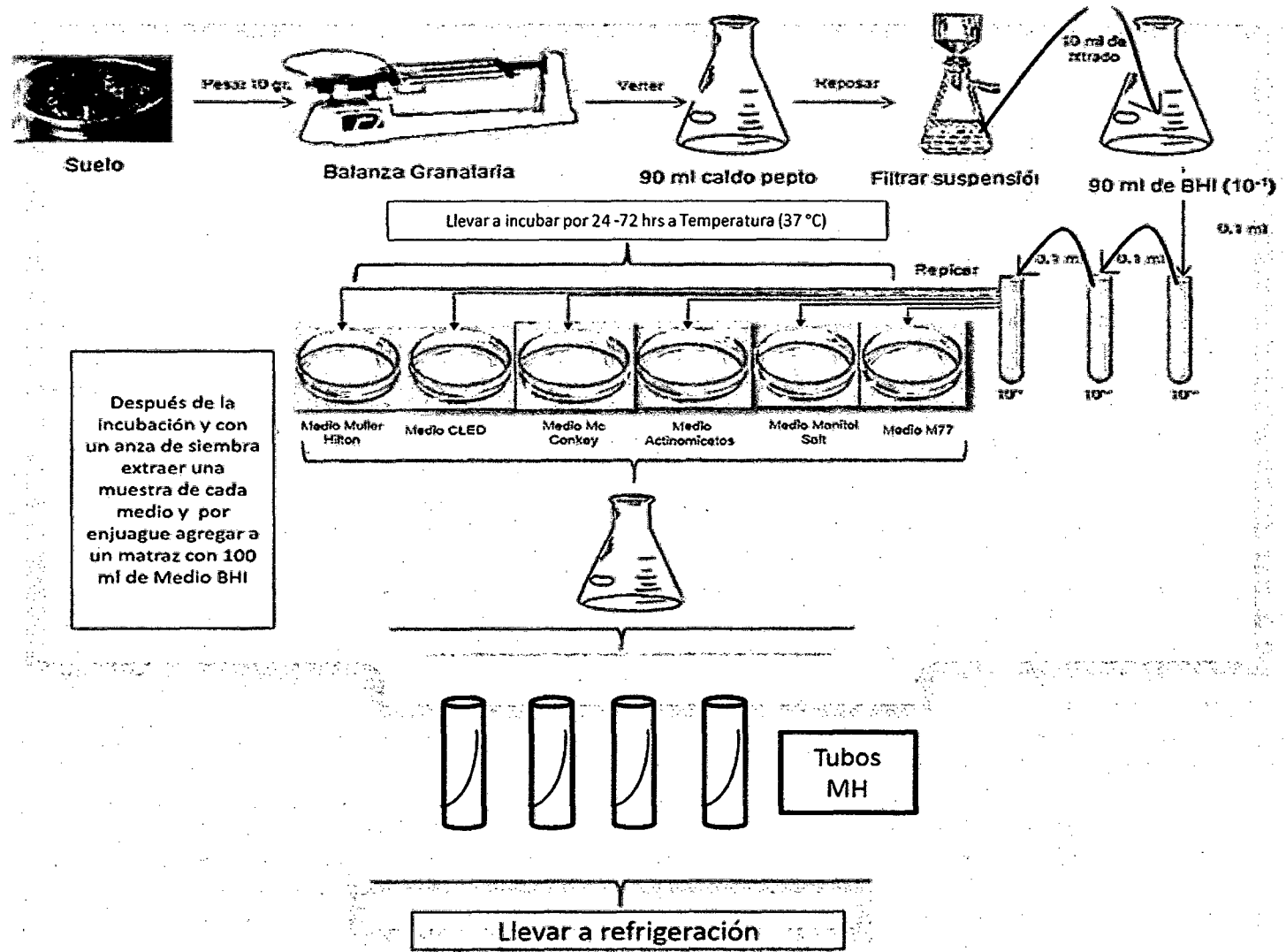
Del mismo matraz con caldo peptona-manitol se procesó la muestra con la técnica de dilución decimal en caldo peptona, se extrajo 1 mL de la muestra y se agregó en un tubo de ensayo con 9 mL de caldo peptona y

así sucesivamente hasta una dilución de 10^{-4} , sembrándose en medio plate count para su respectiva enumeración (BRADSHOW, 2000).

Con la ayuda de un anza de siembra y por el método de estrías se repicó la última dilución en placas con 10mL de medio Muller Hilton (MH), medio CLED, medio Actinomicetos, medio Mac Conkey, medio M77 y medio Manitol Salado. El medio M77 y actinomicetos se incubaron a temperatura ambiente por 24 a 48 horas, el resto de los medios se incubaron a una temperatura de 37°C por 24 a 48 horas, permitiendo así el desarrollo bacteriano de especies ahí presentes, luego se procedió a una identificación bioquímica diferencial (BRADSHOW, 2000):

Las colonias desarrolladas se mezclaron y repicaron en 100 mL de caldo BHI se incubó por 48 horas a temperatura de 37 °C, al término de la incubación se repicó por el método de estrías en cuatro (4) tubos de ensayo contenían el medio Muller Hilton, se llevó a incubación por 24 a 48 horas a temperatura de 37 °C, posteriormente se mantuvo en refrigeración para su uso en la etapa de adaptación (BRADSHOW, 2000).

Figura 3. Diagrama del proceso de aislamiento de microorganismos.



3.6. Etapa de adaptación – selección de bacterias en biopelículas biotrasformadoras de cadmio.

Para la etapa de adaptación y selección primero se activaron las colonias mantenidas en refrigeración en plano inclinado, esto se realizó de la siguiente manera: con un anza de siembra de extrajo del plano inclinado una muestra y se repico en 100mL de BHI (por enjuague) el cual se llevó a incubación por 48 hrs a temperatura de 37°C (SCRAGG, 2002).

Al término de la incubación y con un anza de siembra se repicó por el método de estrías el contenido de las colonias del caldo BHI sobre placas con agar mínimo de sales minerales adicionado con concentraciones bajas (0.6 ppm, 1 ppn, 2 ppm y 3 ppm) de cadmio. Se seleccionó las bacterias que crecieron en la más alta concentración probada en esta etapa, se repicó en caldo BHI, se incubó por 48 hs a temperatura de 37 °C y se mantuvo en refrigeración hasta la operación en los biorreactores (SCRAGG, 2002).

Es preciso mencionar que se aisló, selecciono e identificó bacterias aplicándose las técnicas de cultivo y aislamiento primario rutinarias y repiques en medios especiales para la identificación bioquímica. BUCHANAN y GIBBONS (1979) citado por KUMAR *et al.* (2001).

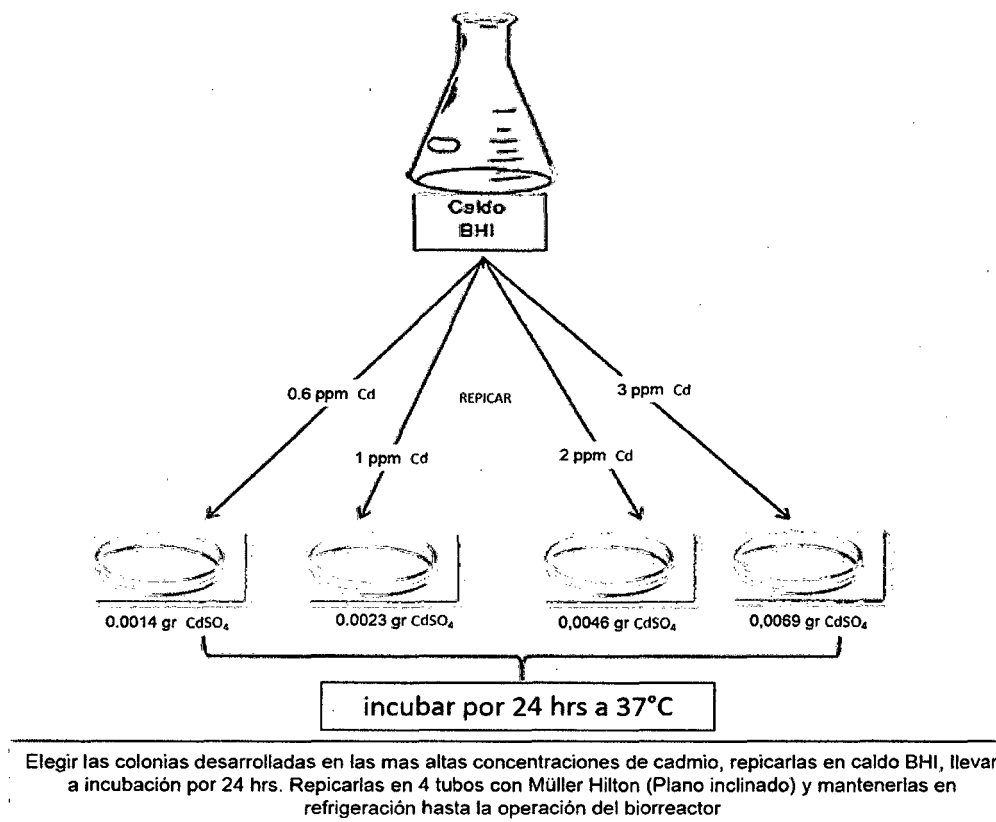


Figura 4. Diagrama del proceso de adaptación - selección de microorganismos.

Debido a que son limitadas las fuentes de cadmio se utilizó Sulfato de cadmio ($\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$) para la prueba de su transformación.

Se realizó los siguientes cálculos con el fin de determinar los gramos de este compuesto que necesitaremos para obtener las concentraciones de cadmio mencionadas anteriormente.

- Primero se calcula el peso molecular (PM), sumando las masa atómica (peso atómico) de los elementos que lo constituyen:

$$\text{Cd} = 112.4 \times 1 = 112.4$$

$$\text{S} = 32.1 \times 1 = 32.1$$

$$\text{O} = 16 \times 4 = 64$$

$$8/3 \text{ H}_2\text{O} = 8/3 \times (18) = 48$$

Total 256.5 g. de CdSO₄.8/3H₂O

- Para determinar la cantidad de sulfato de cadmio necesario para aportar 0.6 ppm de cadmio se formula la regla de tres.

256.5 g. de CdSO ₄ .8/3H ₂ O	→	112.4 g de Cd
X	→	0.6 mg/l de Cd

X = 1.37 mg/L de CdSO₄.8/3H₂O.

1.37 mg	→	1000 mL
X	→	100 mL

X = 0.14mg de CdSO₄.8/3H₂O para 100 mL de medio mínimo de sales.

Entonces:

Para 0.6 mg/l de Cd: **0.0014 g de CdSO₄.8/3H₂O**

Para 1 mg/l de Cd: **0.0023 g de CdSO₄.8/3H₂O**

Para 2 mg/l de Cd: **0.0046 g de CdSO₄.8/3H₂O**

Para 3 mg/l de Cd: **0.0067 g de CdSO₄.8/3H₂O**

Debido a que se necesitaría diluir el compuesto en 20mL del MMS y por lo que serían muy pequeños los pesos al pesar, se realizó la obtención de las concentraciones deseadas por el método de dilución.

- Se preparó 500mL de medio mínimo de sales de los cuales se separó en otro matraz 200mL de medio mínimo de sales y se le agregó 0.0014 g de $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$ que representa 3mg/L de cadmio en 200mL.

$$0.0067 \text{ g} \quad \longrightarrow \quad 1000 \text{ mL}$$

$$X \quad \longrightarrow \quad 200 \text{ mL}$$

$$X = 0.0014\text{gr CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$$

- De los 200mL se separó 20mL y se agregó a una placa por completo obteniendo así en una placa la concentración de 3ppm de cadmio.
- De la muestra restante cuyo concentración es de 3 mg/L de cadmio, se separó 20 mL, al cual se le agregó 10mL de MMS sin ninguna concentración de esta manera obtuvimos un volumen de 30mL de MMS a una concentración de 2 mg/L de cadmio, se separó 20mL de esta dilución y se agregó a una placa obteniendo así en una placa la concentración de 2 mg/L de cadmio.
- De la muestra restante cuyo concentración es de 3 mg/L de cadmio, se separó 20 mL, al cual se le agregó 40mL de MMS sin ninguna

concentración de esta manera obtuvimos un volumen de 60mL de MMS a una concentración de 1ppm de cadmio, se separó 20mL de esta dilución y se agregó a una placa, obteniendo así en una placa la concentración de 1 mg/L de cadmio.

- De los 40mL de MMS cuya concentración es de 1ppm de cadmio que quedó se le agregó 26,7 mL de MMS sin ninguna concentración, se obtuvo un volumen de 66.7mL de MMS a una concentración de 0.6 mg/L de cadmio, se separó 20mL para agregarlo a una placa, obteniendo así en una placa la concentración de 0.6 mg/L de cadmio.

3.7. Preparación de biorreactores air lift

Los biorreactores tipo air lift que se utilizaron para este trabajo fueron preparados en el laboratorio, constituidos por una cámara de cultivo cilíndrica de vidrio de 100mm de diámetro de 200 mm de altura, tubo deflector o de distribución central de 80 por 28 mm y frascos con solución saturada de NaCl como filtros para aire, la fuente de aeración fue una bomba de aire doble salida (ELITE 802) la que proporcionó 1,100 mL/min O₂ (LÓPEZ, 1998; MIRANDA et al., 2006).

La cámara de cultivo y tubo deflector o de distribución de los bioreactores se esterilizaron al vapor de agua, utilizando el autoclave a 121°C a 15lbs/pulg² por 15 minutos; y se esterilizaron por sumersión en solución

alcohol-ácida al 1% (etanol – HCl) Los accesorios del biorreactor como son la cubierta superior (material micro poroso), válvulas de control de entrada/salida de aire y conectores de flujo de aire (LÓPEZ, 1998; MIRANDA et al., 2006).

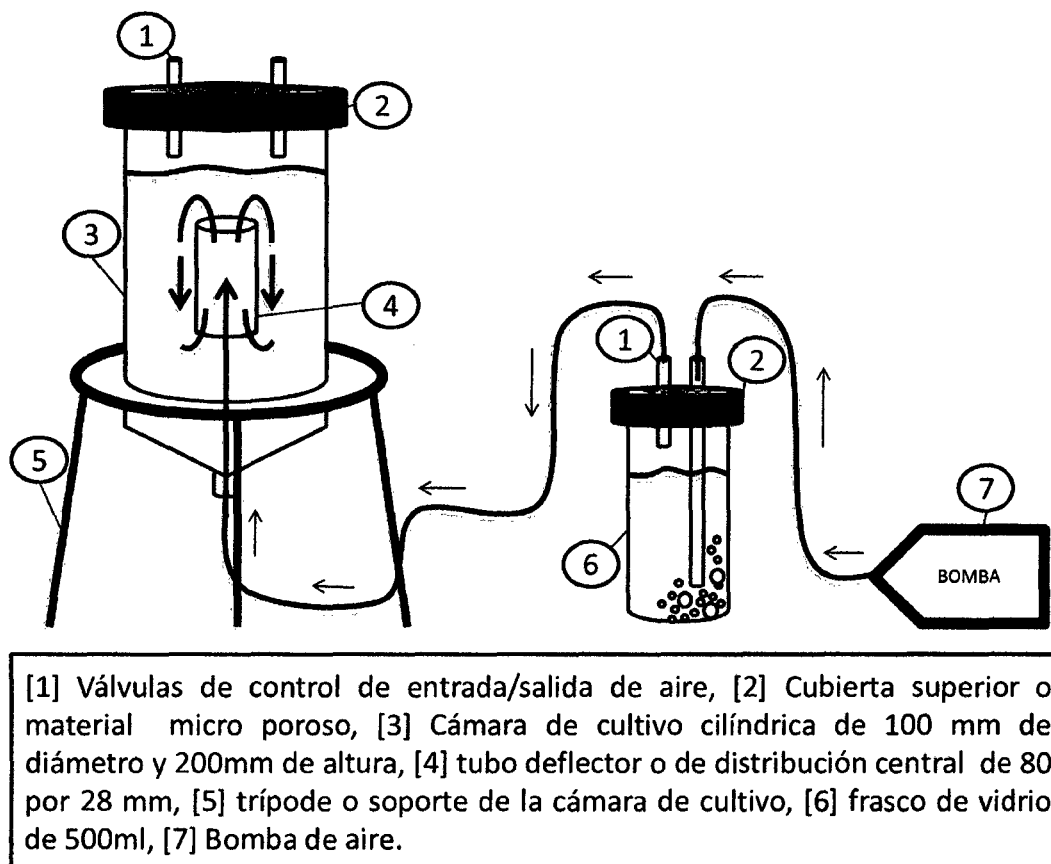


Figura 5. Esquema del biorreactor air lift.

3.8. Operación en los biorreactores

Las bacterias seleccionadas y mantenidas en refrigeración, fueron reactivadas en nuevos medios BHI constituyéndose en inóculos de siempre para los biorreactores tipo air lift en una proporción de 15% del volumen total del biorreactores (1,000 mL).

Las concentraciones de cadmio que se agregó a los biorreactores fueron 100 veces mayores que los utilizados en la etapa de adaptación – selección de bacterias por lo que estas fueron de 60 ppm, 100 ppm, 200 ppm y 300 ppm de cadmio (SCRAGG, 2002).

Utilizando el Sulfato de cadmio: $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$ se calculó su peso molecular (PM) para determinar la cantidad de sulfato de cadmio necesario para aportar 60 mg/L de cadmio de la siguiente manera:

$$\begin{array}{ccc} 256.5 \text{ g. de } \text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O} & \longrightarrow & 112.4 \text{ g de Cd} \\ & & \\ & \text{X} & \longrightarrow & 60 \text{ mg/l de Cd} \end{array}$$

$$X = 136.9 \text{ mg/l. de } \text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}.$$

$X = 136.9 \text{ mg de } \text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$ para 1l de medio mínimo de sales.

Entonces:

Para 60 mg/l de Cd: **0.14 g de $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$**

Para 100 mg/l de Cd: **0.22 g de $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$**

Para 200 mg/l de Cd: **0.46 g de $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$**

Para 300 mg/l de Cd: **0.69 g de $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$**

La operación en batch se inició al poner en funcionamiento las bombas aireadoras con un tiempo de operación de 7 días.

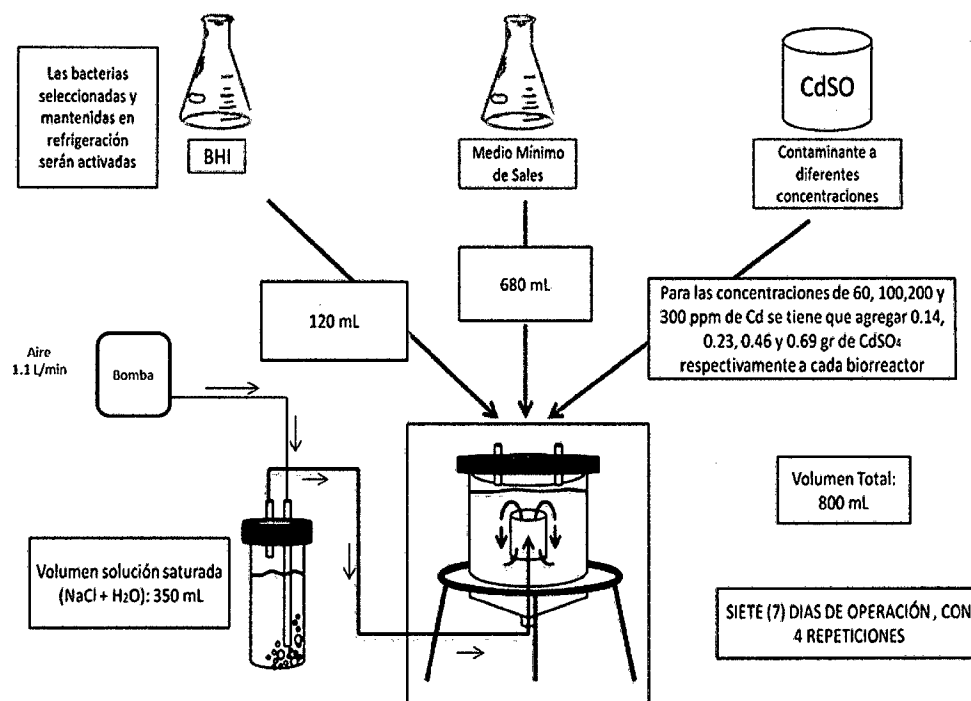


Figura 6. Esquema de la operación en el biorreactor.

3.9. Datos registrados.

3.9.1. Parámetros de control en el experimento:

- Determinación de oxígeno disuelto

Se determinaron mediante el método de membrana adaptada utilizando Oxímetro de marca HANNA de modelo HI 9146 debidamente calibrado, realizando una prueba testigo al inicio de la operación, a los tres días y al final de la operación del biorreactor (siete días). Los resultados se reportó en mg/L

- **Determinación del pH.**

Se utilizó para la determinación de pH, un pHmetro debidamente calibrado marca EXTECH de modelo 47227, los datos se registraron al inicio de la operación, a los tres días y al final de la operación del biorreactor.

- **Determinación de temperatura.**

La temperatura interna de la operación se midió al inicio, a los tres días y al final de la operación (siete días), por los termómetros ambientales calibrados (ROAST) modelo JR - 5.

3.9.2. Determinación de la biomasa

Para la determinación de la biomasa se procedió con la siembra en placas Petri para los cuales se realizó las diluciones seriadas en tres tubos de ensayo de 100 uL de muestra extraídos del biorreactor con una pipeta, del cual se hizo una siembra en profundidad en Agar Place Count de 100 uL del ultimo tubo de la serie de muestra llevándose a la incubadora a 37°C por 24 horas debidamente selladas para evitar la contaminación, posteriormente se realizó el conteo de las colonias, expresándose en células por mililitros (cél/mL) o unidad formadora de colonias por mililitros (UFC/mL) (BRADSHOW, 2000).

3.9.3. Determinación del peso húmedo

Obtener 25 mL del cultivo, pesar en balanza, centrifugar los 25 mL del cultivo, y pesar el sedimento eliminando la suspensión o sobrenadante, en ambos pesos se descuenta el peso del recipiente que lo contiene.

3.9.4. Eficiencia de biotransformación.

Se calculó la eficiencia de biotransformación de cadmio mediante una correlación porcentual entre la concentración inicial y final de Cadmio presentes en cada biorreactor, según la fórmula (TAKE *et al.*, 2012):

$$E_{btr} = \left(\frac{C_i - C_f}{C_i} \right) * 100$$

Dónde:

E_{btr} = eficiencia de biotransformación (%)

C_i = Concentración inicial de Cd (mg/L)

C_f = Concentración final de Cd (mg/L)

3.9.5. Determinación de concentración final de cadmio

La concentración de cadmio de los efluentes de los biorreactores fueron determinadas al finalizar los tratamientos de acuerdo a los métodos estándar, el equipo utilizado fue un espectrofotómetro de absorción atómica de flama (Perkin Elmer 5000), a una longitud de onda de 228.8 nm, aplicando el método 7420 (USEPA, 1994). Se realizó en el Laboratorio de suelos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

3.9.6. Rendimiento en biomasa

Se calculó mediante una correlación porcentual entre la biomasa inicial y final de microorganismos del suelo y la concentración inicial y final de cadmio presentes en cada biorreactor, mediante la siguiente fórmula (SHULER *et al.*, 2002):

$$R_E = \left(\frac{X_f - X_i}{C_i - C_f} \right) * 100$$

Dónde:

R_E = Rendimiento (%)

X_i = Biomasa inicial (gcél/L).

X_f = Biomasa final (gcél/L).

C_i = Concentración inicial de Cd (mg/L)

C_f = Concentración final de Cd (mg/L)

3.9.7. Identificación de microorganismos

Para la identificación de las bacterias que biotransforman el Cadmio (Cd), se repicó alícuotas de 100 uL a partir de los efluentes de los biorreactores en placas Petri con medio Muller Hilton (MH), medio CLED, medio Actinomicetos, medio Mac Conkey, medio M77 y medio Manitol Salado, se incubó a 37°C por 24 horas, se escogió las colonias con diferentes características culturales y posteriormente se realizó pruebas en medios bioquímicos diferenciales para su identificación (GARRITY *et al.*, 2005) (ver ANEXO, APENDICE 1, FIGURA 5, 6, 9, 12).

3.10. Diseño experimental

Se trabajó para un tipo de inóculo (A1) 4 concentraciones diferentes del metal (B1= 60 mg/L, B2 =100 mg/L, B3 =200 mg/L y B4 =300 mg/L), por lo que se tuvo 4 biorreactores en funcionamiento de modo que se evaluó la eficiencia de biotransformación (EF), el consecuente rendimiento (RE), la biomasa de las bacterias del suelo (BM), oxígeno disuelto (OD), pH y temperatura (T) según el siguiente esquema:

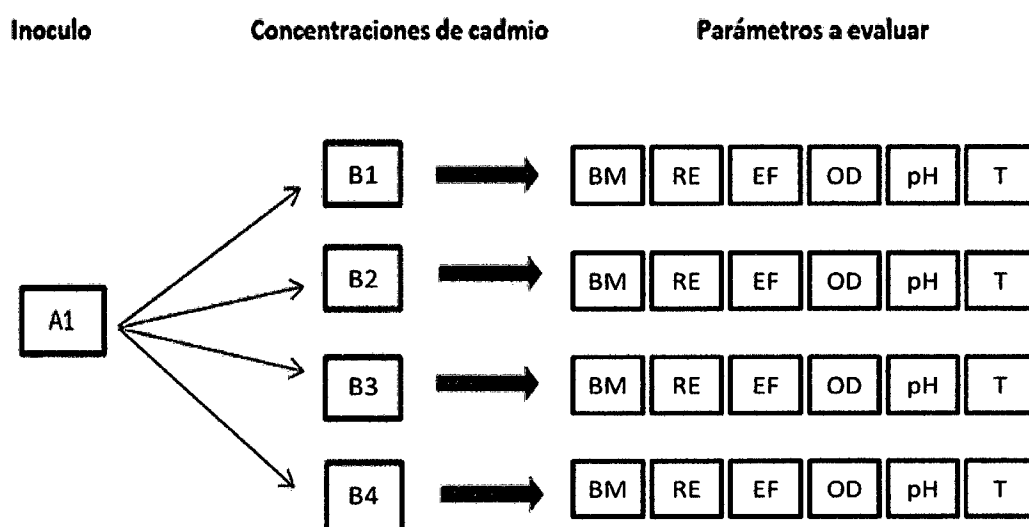


Figura 7. Diseño experimental.

Leyenda:

[A1]: Inoculo;

[B1]: 60 mg/L Cd,

[B2]: 100 mg/L Cd,

[B3]: 200 mg/L Cd,

[B4]: 300 mg/L Cd,

[BM]: Biomasa,

[RE]: Rendimiento,

[EF]: Eficiencia,

[OD]: Oxígeno Disuelto,

[pH]: pH,

[T]: Temperatura.

3.10.1. Variables dependientes

- Rendimiento de biomasa (RE)
- Eficiencia de biotransformación (EF)
- Biomasa de bacterias del suelo en biopelículas (BM)

3.10.2. Variables independientes

- Concentración de Cd (B1, B2, B3, B4)

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos en estudio.

Tratamiento	Concentración de de Cd (ppm)	Inoculo (mL)	Repeticiones
T1	60	120	4
T2	100	120	4
T3	200	120	4
T4	300	120	4

Fuente: Elaboración propia

3.11. Análisis estadístico

3.11.1. Análisis de varianza (ANOVA)

Se distribuyó las variables estadísticas y tratamientos de acuerdo al diseño experimental utilizando el modelo estadístico completamente al azar (DCA) con 4 repeticiones. Con arreglo factorial:

Factor A : Bacterias del suelo

Niveles : (1 intervalos de inoculo)

Factor B : Concentración de Cd

Niveles : (4 intervalos de concentración)

Un arreglo factorial de un DCA de la siguiente manera:

1A x 4B = 4 tratamientos o $2^2 = 4$ tratamientos

Cuadro 3. Análisis de Varianza (ANOVA).

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Significancia
Tratamientos	t - 1	ST - e	Sctrat/Gltrat	Cmtrat/Cme	Fc > Ft
Error	t(r - 1)	SCT - Sctrat	Scerror/Gle		
TOTAL	tr - 1				

Fuente: Elaboración propia

3.11.2. Modelo Aditivo Lineal

Aplicando la fórmula siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + B_j + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Es la respuesta obtenida en la k-ésima observación a la cual se le aplica el i-ésimo tratamiento.

μ = Efecto de la media general.

B_j = Es el efecto del i-ésimo tratamiento.

ε_{ijk} = Es el efecto aleatorio del error experimental.

Para:

$i = 1, 2, 3, 4$ tratamientos.

$K = 1, 2, 3, 4$ observaciones.

3.11.3. Prueba HSD Tukey

Se empleó la Diferencia Francamente Significativa de Tukey (HSD Tukey) a fin de determinar diferencias significativas de biotransformación de cadmio entre medias de tratamientos, para nivel de significación de 5%.

IV. RESULTADOS

4.1. Identificación de microorganismos aislados

Con los resultados de las pruebas bioquímicas diferenciales se determinaron los géneros de *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y un perteneciente al grupo de los Actinomicetos. En el cuadro 4 se presentan los resultados de las pruebas diferenciales para dichos géneros.

Cuadro 4. Resultados de pruebas bioquímicas de identificación de las cepas aisladas.

PRUEBAS	CEPAS AISLADAS				
	1	2	3	4	5
Indol	-/+	-	-	-	+
Rojo de Metilo	-	-	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+
TSI	K/A	K/A	K/A	K/A	K/K
Lactosa	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	+	-

Oxidación/ Fermentación	+/-	+/ \pm	+/ \pm	+/-	+/-
LIA	K/K	K/K	K/A	K/K	K/K
Urea	+	+/-	+/-	-	-
Manitol	-	-	-	\pm	+
Oxidasa/ Catalasa	+/-	+/-	+/-	+/-	d
Coagulasa	-	-	-	-	-
Gelatina	+	+	+	-	-
Género Identificado	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Actinomiceto</i>

Fuente: Elaboración propia

4.2. Determinación de los géneros de bacterias del suelo en biopelícula más eficiente para biotransformar el cadmio

Los géneros de bacterias utilizados en mezcla como inóculos para la biotransformación de cadmio fueron: *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y un género de Actinomicetos, en el cuadro 5 se indica el desarrollo de las bacterias aisladas en comparación frente a concentraciones bajas de Cd en la etapa de adaptación, destacándose que *Pseudomonas* se desarrolla en todas las concentraciones de adaptación.

Cuadro 5. Bacterias desarrolladas en diferentes concentraciones de cadmio en la etapa de adaptación.

[Cd] mg/L	MICROORGANISMOS AISLADOS		
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	Actinomicetos
0.6	+	+	+
1	+	-	+
2	+	-	-
3	+	-	-

Fuente: Elaboración propia

+ : Desarrollo - : No desarrollo

4.3. Datos obtenidos del biorreactor en operación

En los cuadros 6, 7, 8 y 9 se indica los datos de temperatura, oxígeno disuelto, pH, biomasa y concentraciones de cadmio obtenidas durante

la operación de los biorreactores air lift en las diferentes repeticiones realizadas.

Cuadro 6. Datos obtenidos de la primera repetición de cuatro (04) biorreactores operando con concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm

1era Repetición						
Biorreactor	[Cd]inicial (ppm)	OD (ppm)	Temperatura (°C)	pH	Biomasa (FD: 0.1ml)	
DIA 1	B1	60	6,46	28	1,35	769 x16
	B2	100	5,72	27,6	5,23	416 x 16
	B3	200	4,6	27	3,79	335 x 8
	B4	300	4,01	28	4,25	231 x 8
DIA 4	B1	60	5,79	27	5,9	482 x 32
	B2	100	5,12	27,1	6,15	419 x 32
	B3	200	4,23	26,8	7,02	245 x 16
	B4	300	3,45	26,9	7,35	495 x 8
DIA 7	B1	60	4,5	26,5	6,72	652 x 32
	B2	100	4,39	26,6	7,25	633 x 32
	B3	200	4,1	26,6	8,01	392 x 16
	B4	300	3,24	26,8	8,89	261 x 16

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 7. Datos obtenidos de la segunda repetición de cuatro (04) biorreactores operando con concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm.

2da Repetición						
Biorreactor	[Cd] _{inicial} (ppm)	OD (ppm)	Temperatura (°C)	pH	Biomasa (FD: 0.1ml)	
DIA 1	B1	60	6,73	28,5	5	240 x 8
	B2	100	6,88	28,3	6,5	275 x 8
	B3	200	6,48	28,5	5	332 x 4
	B4	300	6,57	28,1	5	320 x 8
DIA 4	B1	60	5,42	28,1	6,5	235 x 16
	B2	100	4,79	27,6	6,95	183 x 16
	B3	200	3,96	28,8	7	330 x 8
	B4	300	3,75	28,5	6,5	414 x 8
DIA 7	B1	60	5,39	29	6,95	471 x 16
	B2	100	4,3	29	7,5	423 x 16
	B3	200	3,78	28,8	7,5	436 x 8
	B4	300	3,09	28,7	7	435 x 8

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 8. Datos obtenidos de la tercera repetición de cuatro (04) biorreactores operando con concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm.

3era Repetición						
Biorreactor	[Cd] _{inicial} (ppm)	OD (ppm)	Temperatura (°C)	pH	Biomasa (FD: 0.1ml)	
DIA 1	B1	60	6,60	28,25	3,18	283 x 8
	B2	100	6,30	27,95	5,87	346 x 8
	B3	200	5,54	27,75	4,4	334 x 16
	B4	300	5,29	28,05	4,63	276 x 8
DIA 4	B1	60	5,61	27,55	6,2	281 x 16
	B2	100	4,96	27,35	6,55	301 x 16
	B3	200	4,10	27,80	7,01	288 x 32
	B4	300	3,60	27,70	6,93	455 x 8
DIA 7	B1	60	4,95	27,75	6,84	562 x 16
	B2	100	4,35	27,80	7,38	528 x 16
	B3	200	3,94	27,70	7,8	414 x 32
	B4	300	3,17	27,75	7,95	348 x 16

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 9. Datos obtenidos de la cuarta repetición de cuatro (04) biorreactores operando con concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm.

4ta Repetición						
Biorreactor	[Cd] _{Inicial} (ppm)	OD (ppm)	Temperatura (°C)	pH	Biomasa (FD: 0.1ml)	
DIA 1	B1	60	3,44	25	6,6	261 x 8
	B2	100	3,88	25,1	6,3	310 x 8
	B3	200	4,27	25,6	6,7	333 x 8
	B4	300	4,44	25,8	6,68	298 x 8
DIA 4	B1	60	3,06	24,8	6,61	258 x 16
	B2	100	3,71	24,5	6,6	242 x 16
	B3	200	3,88	24,8	6,83	309 x 16
	B4	300	3,17	24,8	6,76	434 x 8
DIA 7	B1	60	2,73	24,5	6,62	516 x 16
	B2	100	3,56	24	6,92	476 x 16
	B3	200	3,54	24	6,96	425 x 16
	B4	300	2,31	23,9	6,86	392 x 16

Fuente: Elaboración propia

4.3.1. Determinación de Oxígeno Disuelto (OD)

En el cuadro 10 se indica los datos de oxígeno disuelto obtenidos de la operación de los biorreactores air lift durante las diferentes repeticiones

realizadas observándose en la figura 8 una disminución progresiva del oxígeno para los diferentes tratamientos.

Cuadro 10. Datos de OD de los diferentes biorreactores tomados durante el inicio, a los 3 días y al finalizar la operación.

Repeticiones	BIORREACTOR 1			BIORREACTOR 2			BIORREACTOR 3			BIORREACTOR 4		
	OD (ppm)											
	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 1	DIA 4	DIA 7
1era repetición	6,46	5,79	4,5	5,72	5,12	4,39	4,6	4,23	4,1	4,01	3,45	3,24
2da repetición	6,73	5,42	5,39	6,88	4,79	4,3	6,48	3,96	3,78	6,57	3,75	3,09
3era repetición	6,6	5,61	4,95	6,3	4,96	4,35	5,54	4,1	3,94	5,29	3,6	3,17
4ta repetición	3,44	3,06	2,73	3,88	3,71	3,56	4,27	3,88	3,54	4,44	3,17	2,31
PROMEDIO	5,81	4,97	4,39	5,70	4,65	4,15	5,22	4,04	3,84	5,08	3,49	2,95

Fuente: Elaboración propia

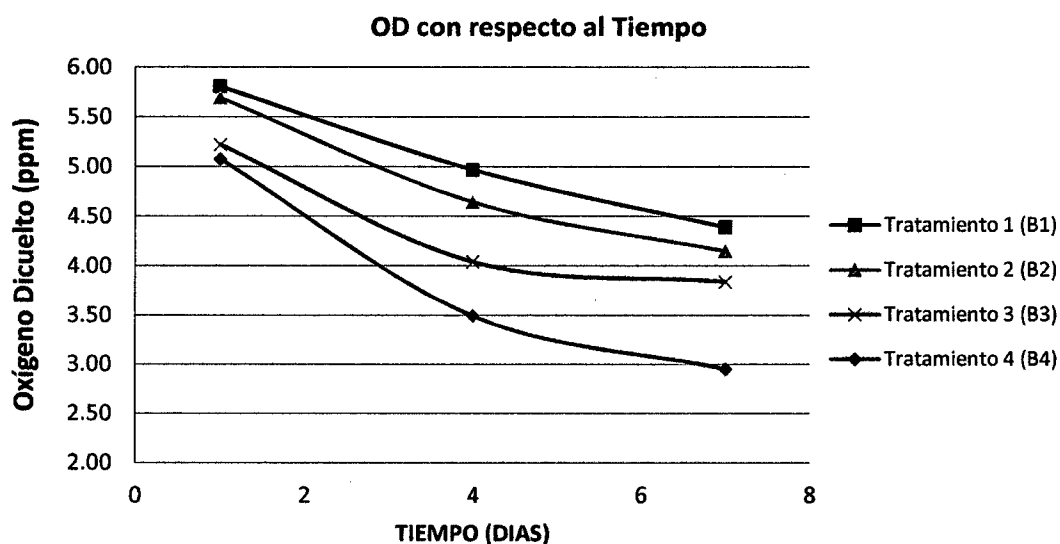


Figura 8. Línea de tendencia del oxígeno disuelto con respecto al tiempo de operación del biorreactor en los diferentes tratamientos (concentración de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm).

4.3.2. Determinación de Temperatura

El promedio de la temperatura en los diferentes tratamientos es de 27 °C, se observa que se mantienen en un rango de 26 – 28 °C siendo estas temperaturas óptimas para el crecimiento del inóculo de bacterias eficientes para la degradación de cadmio.

Cuadro 11. Datos de Temperatura en los diferentes biorreactores con los tratamientos de 60, 100, 200 y 300 ppm de cadmio tomados durante el inicio, a los 3 días y al finalizar la operación.

	BIORREACTOR 1			BIORREACTOR 2			BIORREACTOR 3			BIORREACTOR 4		
Repeticiones	Temperatura (°C)											
	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 1	DIA 4	DIA 7
1era repetición	28	27	26,5	27,6	27,1	26,6	27	26,8	26,6	28	26,9	26,8
2da repetición	28,5	28,1	29	28,3	27,6	29	28,5	28,8	28,8	28,1	28,5	28,7
3era repetición	28,25	27,55	27,75	27,95	27,35	27,8	27,75	27,8	27,7	28,05	27,7	27,75
4ta repetición	25	24,8	24,5	25,1	24,5	24	25,6	24,8	24	25,8	24,8	23,9
PROMEDIO	27,4	26,9	26,9	27,2	26,6	26,9	27,2	27,1	26,8	27,5	27,0	26,8

Fuente: Elaboración propia

4.3.3. Determinación de pH

En el cuadro 12 se indica los datos de pH obtenidos de la operación de los biorreactores air lift durante las diferentes repeticiones realizadas observándose en la Figura 9 un aumento progresivo del pH para los diferentes tratamientos.

Cuadro 12. Datos de pH en los diferentes biorreactores tomados durante el inicio, a los 3 días y al finalizar la operación.

Repeticiones	BIORREACTOR 1			BIORREACTOR 2			BIORREACTOR 3			BIORREACTOR 4		
	pH											
	DÍA 1	DÍA 4	DÍA 7	DÍA 1	DÍA 4	DÍA 7	DÍA 1	DÍA 4	DÍA 7	DÍA 1	DÍA 4	DÍA 7
1era repetición	1,35	5,9	6,72	5,23	6,15	7,25	3,79	7,02	8,01	4,25	7,02	8,89
2da repetición	5	6,5	6,95	6,5	6,95	7,5	5	7	7,5	5	6,5	7
3era repetición	3,18	6,2	6,84	5,87	6,55	7,38	4,4	7,01	7,8	4,63	6,93	7,95
4ta repetición	6,6	6,61	6,62	6,3	6,6	6,92	6,7	6,83	6,96	6,68	6,76	6,86
PROMEDIO	4,03	6,30	6,78	5,98	6,56	7,26	4,97	6,97	7,57	5,14	6,80	7,68

Fuente: Elaboración propia

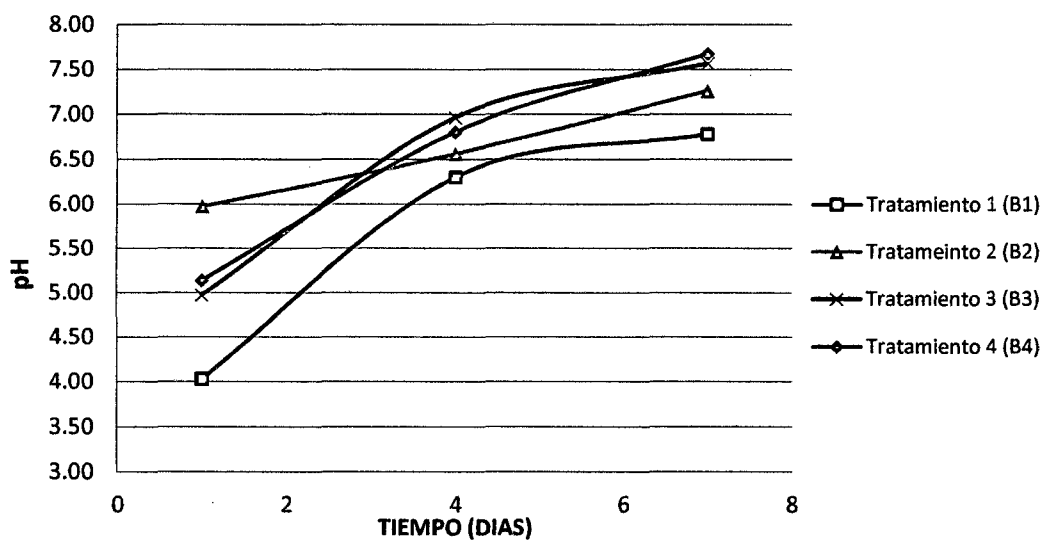


Figura 9. Línea de tendencia del pH con respecto al tiempo de operación del biorreactor en los diferentes tratamientos (concentración de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm).

4.4. Determinación de concentración final de cadmio

En el cuadro 13 se indica las concentraciones finales del cadmio de los efluentes de los biorreactores en las diferentes repeticiones realizadas, observándose que las concentraciones de los efluentes de los biorreactores al finalizar la operación disminuyen en proporción a las concentraciones iniciales determinadas.

Cuadro 13. Concentraciones de cadmio determinadas al finalizar el tratamiento a 7 días de exposición en concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm

REPETICIÓN	Concentración Final de Cadmio (mg/L)			
	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento
	1	2	3	4
1era	44,9	47,9	78,5	211,4
2da	38,2	68	21,8	191,8
3ra	41,55	57,95	50,15	201,6
4ta	36	26	21	23
PROMEDIO	40,16	49,96	42,86	156,95

Fuente: Elaboración propia

4.5. Determinación Biomasa bacteriana.

En el cuadro 14 se indica los datos del crecimiento microbiano durante las diferentes repeticiones realizadas, observándose en la figura 10 el aumento progresivo de promedios de biomasa microbiana en los diferentes tratamientos durante el tiempo de operación de los biorreactores.

Cuadro 14. Datos de biomasa en los diferentes biorreactores con los tratamientos de 60, 100, 200 y 300 ppm de cadmio tomados durante el inicio, a los 3 días y al finalizar la operación.

REP	BIORREACTOR 1			BIORREACTOR 2			BIORREACTOR 3			BIORREACTOR 4		
	BIOMASA (UFC/mL)(10 ³)											
	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 1	DIA 4	DIA 7
1ra	123000	154320	208640	66560	134080	202560	26800	39200	62720	18480	39600	41760
2da	19200	37600	75360	22000	29280	67680	13280	26400	34880	25600	33120	34800
3ra	22600	44880	89840	27640	48160	84480	53360	92000	132480	22040	36360	55680
4ta	20900	41240	82600	24820	38720	76080	26620	49400	68000	23820	34740	62640
PROM	46425	57010	114110	35255	62560	107700	30015	51750	74520	22485	35955	48720

Fuente: Elaboración propia

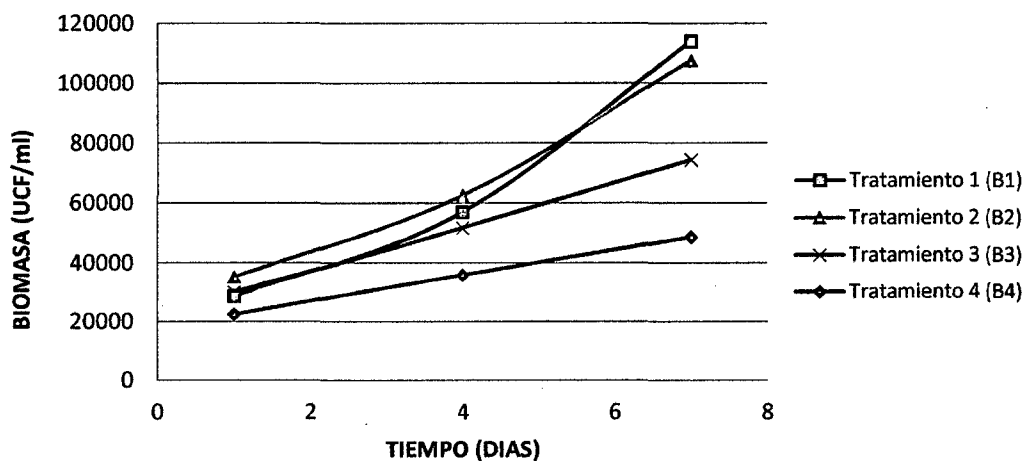


Figura 10. Línea de tendencia de promedios de biomasa bacteriana con respecto al tiempo de operación del biorreactor en los diferentes tratamientos (concentración de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm).

4.6. Determinación de biomasa por peso húmedo

En el cuadro 15 se indica los datos del peso húmedo de biomasa durante la operación en biorreactores con diferentes tratamientos 60, 100, 200 y 300 ppm de cadmio (Cd) y repeticiones realizadas.

Cuadro 15. Datos del peso húmedo de biomasa en los diferentes biorreactores con los tratamientos de 60, 100, 200 y 300 ppm de cadmio (Cd) tomados durante el inicio, a los 3 días y al finalizar la operación.

BIOMASA x 10 ⁻⁴ (g/L)												
Repetición	BIORREACTOR 1			BIORREACTOR 2			BIORREACTOR 3			BIORREACTOR 4		
	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 1	DIA 4	DIA 7	DIA 1	DIA 4	DIA 7
1ra	246	308,64	417,28	133,12	268,16	405,12	53,6	78,4	125,44	36,96	79,2	83,52
2da	38,4	75,2	150,72	44	58,56	135,36	26,56	52,8	69,76	51,2	66,24	69,6
3ra	45,2	89,76	179,68	55,28	96,32	168,96	106,72	184	264,96	44,08	72,72	111,36
4ta	41,8	82,48	165,2	49,64	77,44	152,16	53,24	98,8	136	47,64	69,48	125,28
PROMEDIO	92,9	114,02	228,22	70,51	125,12	215,4	60,03	103,5	149,04	44,97	71,91	97,44

Fuente: Elaboración propia

4.7. Determinación del grado de eficiencia en la biotransformación

La mayor eficiencia se observa en el Biorreactor tres (3) con un tratamiento de 200 ppm de concentración inicial de cadmio, dio como resultado un promedio de 78,58 % de eficiencia de biotransformación y la menor eficiencia en el Biorreactor uno (1) cuyo tratamiento es de 60 ppm de concentración inicial de cadmio dio como resultado un promedio de 33,18 % de eficiencia de biotransformación.

El cuadro 16 indica los datos del porcentaje de eficiencia de biotransformación en las diferentes repeticiones realizadas observándose en la Figura 11 la línea de tendencia de los promedios de eficiencia para cada biorreactor.

Cuadro 16. Datos del porcentaje de eficiencia al finalizar el tratamiento a 7 días de exposición en concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm

REPETICIÓN	EFICIENCIA DE BIOTRANSFORMACIÓN DE CADMIO (%)			
	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento
	1	2	3	4
1ra	25,2	52,1	60,8	29,5
2da	36,7	32	89,1	36,1
3ra	30,8	42,1	74,9	32,8
4ta	40	74	89,5	92,3
PROMEDIO	33,18	50,05	78,58	47,68

Fuente: Elaboración propia

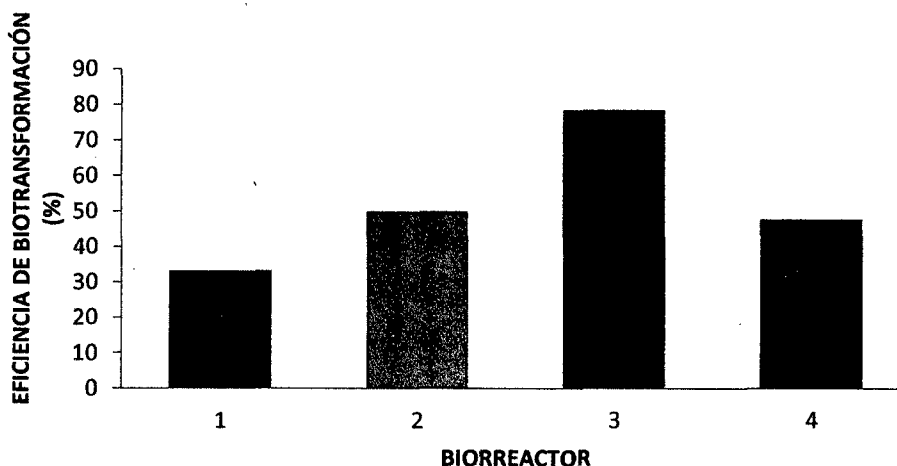


Figura 11. Línea de tendencia de los promedios en porcentaje de la eficiencia de biotransformación en los diferentes tratamientos, observando alta eficiencia de biotransformación para el tratamiento del biorreactor 3 y baja para biorreactor 1.

4.8. Determinación del rendimiento en biomasa

El mayor rendimiento se observa en el Biorreactor uno (1) cuyo tratamiento es de 60 mg/L de concentración inicial de cadmio, dió como promedio un 68,23 % y el menor rendimiento en el Biorreactor cuatro (4) cuyo tratamiento es de 300 ppm de concentración inicial de cadmio, dió como resultado un promedio de 3,67 %.

Cuadro 17. Datos del porcentaje de rendimiento al finalizar el tratamiento a 7 días de exposición en concentraciones de cadmio de 60, 100, 200 y 300 ppm

RENDIMIENTO EN BIOMASA (%)				
REPETICIÓN	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
1ra	86,33065	54,35651	4,57172	3,25481
2da	56,61290	18,25739	2,74914	1,28626
3ra	67,78226	22,71783	10,07000	4,70325
4ta	62,19758	20,48761	5,26664	5,42747
PROMEDIO	68,23085	28,95484	5,66438	3,66795

Fuente: Elaboración propia

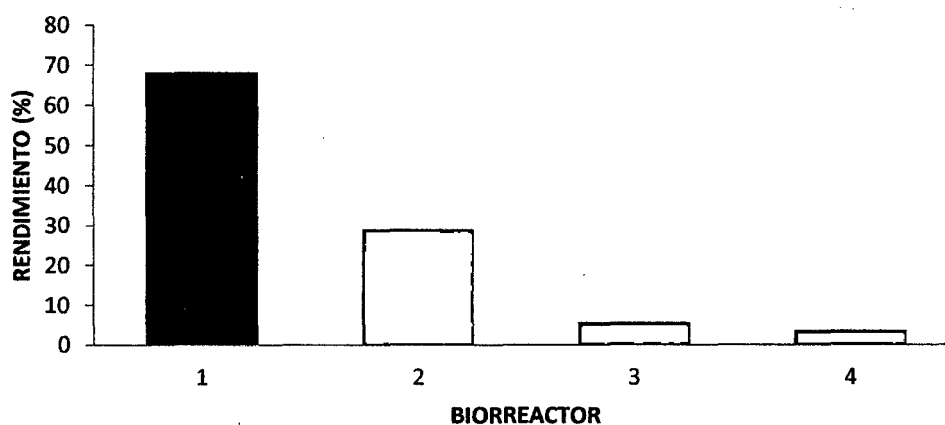


Figura 12. Línea de tendencia del promedio del rendimiento en biomasa en porcentaje en los diferentes tratamientos, observando mayor rendimiento para el tratamiento del biorreactor 1 y bajo para biorreactor 4.

4.9. Datos por biorreactor

Figura 13. BIORREACTOR 1; mayor cantidad de microorganismos en masa (114110 UFC/ml), eficiencia de biotransformación 33,18 % y rendimiento 68,23 %, obteniendo el más bajo porcentaje de eficiencia y el mejor rendimiento con respecto a los otros tratamientos.

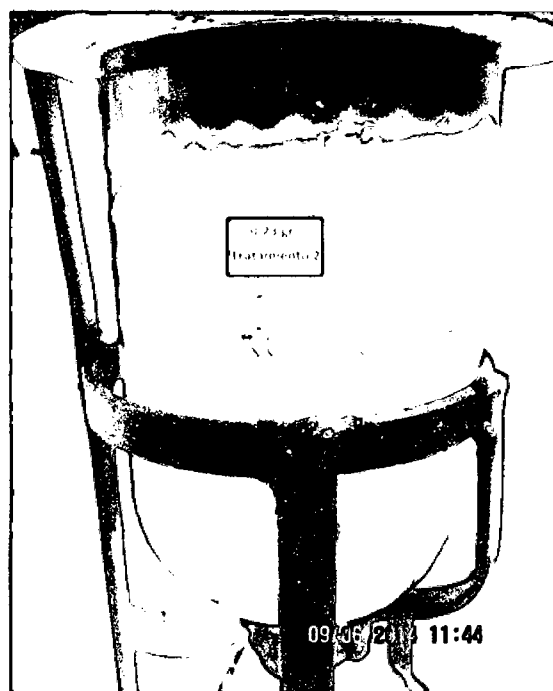
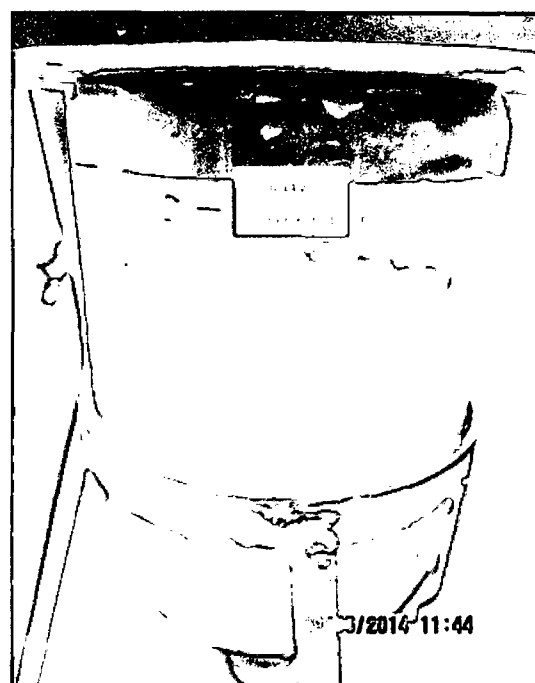


Figura 14. BIORREACTOR 2; menor cantidad de microorganismos en masa (48720 UFC/ml), eficiencia de biotransformación es del 47,68% y rendimiento 28,95%, obteniendo un bajo porcentaje de eficiencia de biotransformación en comparación a los tratamientos del biorreactor 2 y 3, y el menor rendimiento en comparación de los demás tratamientos.

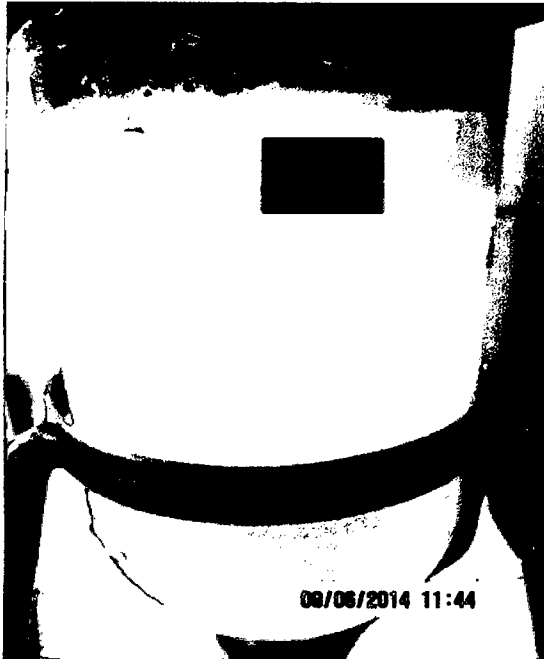
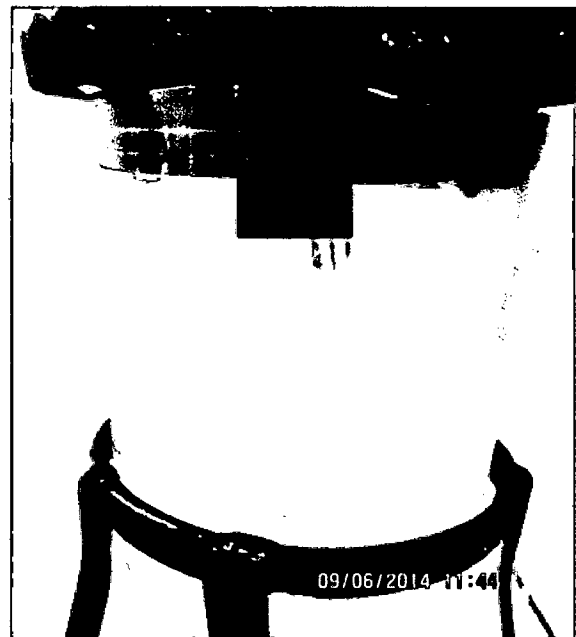


Figura 15. BIORREACTOR 3; la cantidad de microorganismos en masa final (74520 UFC/ml), eficiencia de biotransformación es del 78,58% y rendimiento 5,66%, obteniendo el más alto porcentaje de eficiencia de biotransformación en comparación a los demás tratamientos y el menor rendimiento en comparación a los tratamientos en el biorreactor 1 y 2.

Figura 16. BIORREACTOR 4; microorganismos en masa (107700 UFC/ml), eficiencia de biotransformación es del 50,05% y rendimiento 3,67%, obteniéndose una eficiencia mayor a los tratamientos en los biorreactores 1 y 4, y un alto rendimiento en comparación de los tratamientos en los biorreactores 3 y 4.



Cuadro 18. Resumen de datos obtenidos a los 7 días de operación en cada biorreactor.

Parametros	Unidad	B1	B2	B3	B4
Biomasa final	UFC/ml x 10 ³	114110	107700	74520	48720
Eficiencia	%	33,18	50,05	78,58	47,68
Rendimiento	%	68,23	28,95	5,66	3,67

Fuente: Elaboración propia

4.10. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los efectos de los tratamientos y la prueba de Tukey para determinar en cuales de los tratamientos se han producido las diferencias.

4.10.1. Análisis de varianza para eficiencia de biotransformación

El análisis de varianza para los promedios de eficiencia de biotransformación de Cd encontrado al finalizar los tratamientos (Cuadro 19), muestra que existe diferencia estadística entre los tratamientos a distintas concentraciones de Cd con valores de significancia menores a 0,05, con un 95 % de nivel de confianza.

Cuadro 19. ANOVA. Eficiencia de Biotransformación de cadmio.

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Significancia
Inter-grupo	3	4330,301875	1443,43396	3,999*	3,99 > 3,49
Intra-grupo	12	4331,6125	360,967708		
TOTAL	15	8661,914375			

Al existir significancia estadística entre tratamientos, se determinó mediante la prueba de HSD de Tukey (33,15) que la comparación de la influencia de las distintas concentraciones de cadmio sobre la eficiencia de biotransformación fue heterogénea: la concentración de 200 ppm tiene efecto diferente respecto a las concentraciones de 60 ppm 100 ppm y 300 ppm; la concentración de 100 ppm tienen efecto diferente respecto a la concentración de 60 ppm; mientras que la concentración de 300 ppm tienen efecto diferente respecto a la concentración de 60 ppm (ver Cuadro 20).

Cuadro 20. Análisis de comparación por HSD de Tuckey

		T3	T2	T4	T1
	Medias	314.3	200.2	190.7	132.7
T3	314,3	-	114,1*	123,6*	181*
T2	200,2	-	-	9,5	67,5*
T4	190,7	-	-	-	58*
T1	132,7	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia

HSD = 33,15

4.10.2. Análisis de varianza para rendimiento en biomasa

El análisis de varianza para los promedios de rendimiento encontrado al finalizar los tratamientos (Cuadro 21), muestra que existe diferencia estadística entre los tratamientos a distintas concentraciones de Cd con valores de significancia menores a 0.05, con un 95% de nivel de confianza.

Cuadro 21. ANOVA del rendimiento en biomasa

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Significancia
Inter-grupo	3	10811,3941	3603,79805	30.69	30.69 > 3.49
Intra-grupo	12	1408,72672	117,393893		
TOTAL	15	25568,5203			

Al existir significancia estadística entre tratamientos, se determinó mediante la prueba de HSD de Tukey que la influencia de las concentraciones de cadmio sobre el rendimiento fue heterogénea: la concentración de 60 ppm tiene efecto diferente respecto a las concentraciones de 100 ppm 200 ppm y 300 ppm; la concentración de 100 ppm tienen efecto diferente respecto a la concentración de 200 ppm y 300 ppm (ver Cuadro 22).

Cuadro 22. Análisis de comparación por HSD de Tuckey.

	T1	T2	T3	T4
Medias	272,923387	115,819345	22,6575029	14,6717931
T1	272,923387	-	157,104043*	250,265884*
T2	115,819345	-	93,1618417*	101,147551*
T3	22,6575029	-	-	7,98570978
T4	14,6717931	-	-	-

Fuente: Elaboración propia

HSD = 20.42

IV. RESULTADOS

4.1. Identificación de microorganismos aislados

Con los resultados de las pruebas bioquímicas diferenciales se determinaron los géneros de *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y un perteneciente al grupo de los Actinomicetos. En el cuadro 4 se presentan los resultados de las pruebas diferenciales para dichos géneros.

Cuadro 4. Resultados de pruebas bioquímicas de identificación de las cepas aisladas.

PRUEBAS	CEPAS AISLADAS				
	1	2	3	4	5
Indol	-/+	-	-	-	+
Rojo de Metilo	-	-	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+
TSI	K/A	K/A	K/A	K/A	K/K
Lactosa	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	+	-

V. DISCUSIÓN

Con respecto a los parámetros físicos determinados durante la operación en los biorreactores, la temperatura interna del biorreactor durante la operación osciló entre 26 - 28 °C, que es un rango óptimo para el desarrollo en biopelícula de los microorganismos que realizan la biorremediación/ biotransformación, esto está sustentado por VERGARA *et al.* (2002) quién indica que la mayoría de los microorganismos que se utilizan en un biorreactor son mesófilos, es decir, pueden desarrollarse o realizar sus funciones metabólicas a temperaturas que oscilan entre los 10 y 35 °C.

Asimismo durante la operación el pH se elevó progresivamente a los 7 días de crecimiento de los microorganismos, este aumento está influenciado por el contaminante utilizado, tal como lo justifica SINHA y KUMAR (2009), que mencionan que el aumento del pH probablemente esté vinculado con la transformación de Cd a una especie insoluble dentro de la célula o alrededor, y contrario a lo afirmado MADIGAN *et al.* (2004), quienes sustentan que normalmente durante la operación del sistema de biorreactor, el pH empieza a decrecer debido a la formación de ácidos intermedios que reaccionan con algunos de los componentes del medio, lo que puede disminuir e incluso detener la

actividad microbiana en el interior del biorreactor, siendo necesario agregar periódicamente al biorreactor una solución alcalina que permita equilibrar el pH.

Se manifiesta una disminución progresiva del oxígeno disuelto (OD) y un aumento progresivo en biomasa de los microorganismos, siendo el oxígeno el sustrato limitante para el crecimiento de microorganismos como nos indica SCRAAG (2002), cuando el cultivo se encuentra en crecimiento, el flujo de entrada oxígeno (F_{iO_2}) será mayor al flujo de salida de oxígeno (F_{fO_2}) debido al consumo de oxígeno disuelto en el líquido por parte de las células o microorganismos en crecimiento y/o división celular. Esto demuestra que los microorganismos que desarrollan en presencia de Cd son estrictamente aerobios.

El incremento de la biomasa desarrollada en biopelícula nos indica microorganismos activos que han utilizado el Cd y lo han transformado, que se confirma con la remoción del contaminante del medio, concordando con RATHOR *et al.* (2003) quienes indican que el aumento equilibrado de biomasa significa la existencia de una mayor cantidad de microorganismos activos presentes en el biorreactor, que requieren una mayor cantidad de oxígeno para realizar su actividad metabólica y asimismo su reproducción.

El desarrollo en biopelícula permiten a estos microorganismos persistir a las condiciones adversas del contaminante modificando su metabolismo, su tasa

de crecimiento para sobrevivir (STEWART, 2003; HARRISON *et al.*, 2005 y MARTÍNEZ *et al.*, 2006).

Al referirnos en nuestro caso a biotransformación, nos referimos a los procesos o sistemas de biorremediación en la cual los microorganismos resistentes poseen mecanismos de detoxificación inducidos por el metal. La tolerancia y resistencia se deben a fenómenos de biosorción, bioacumulación, biotransformación, biomineralización y quimiosorción, pero se abreviaban con el término de biotransformación pues no necesariamente al final se logra una mineralización completa del metal pesado o contaminante, tal como lo afirman VERMA *et al.* (2009) y CHENG y LI (2009).

En referencia a la eficiencia exhibida por los microorganismos del género *Pseudomonas* en biopelículas al reducir las concentraciones de Cd^{2+} , que es conocido su efecto de biotransformación o reducción sobre otros metales como el Cr (VI) a Cr (III) (CHENG y LI, 2009 y HRYNKIEWICZ, *et al.*, 2014), estaría actuando de similar manera con el cadmio, produciendo en el metal un cambio químico en el estado de oxidación o metilación, que es mediado por enzimas microbianas, lo que da como resultado compuestos poco solubles o compuestos volátiles; estas enzimas *in vitro*, pueden tener su actividad máxima bajo condiciones diferentes a las óptimas de crecimiento del microorganismo concordando con lo mencionado por MARTÍNEZ *et al.* (2006); STEWART (2003); VULLO (2003) y PARK *et al.* (2000).

De otra parte la transformación también involucra la biomineralización, proceso que como una bomba se expulsa el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior celular, en contracorriente a un flujo de H⁺ hacia el interior celular, lo que produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa, de ahí el aumento del pH, y la precipitación del metal, esto involucra un mecanismo microbiano de resistencia codificado en plásmidos. Por último, está inherente el proceso de la quimiosorción por la que los microorganismos forman un depósito primario de un metal, que funciona como un núcleo de cristalización que promueve y acelera la biomineralización de éste (GAO *et al.*, 2006).

La eficiencia de biotransformación del 78,58 % en un tratamiento con 200 ppm de Cadmio nos refiere que los microorganismos del género *Pseudomonas* desarrollados en biopelículas tienen mayor capacidad de reducción del metal a concentraciones moderadas en las cuales la capacidad de biodegradabilidad y biodisponibilidad del metal no exceda a la capacidad de biodegradación del microorganismo, aún no ostente una considerable biomasa celular, considerándose a estas concentraciones como las que inducen al metabolismo celular designándose como concentración mínima de sustrato y a concentraciones bajas las tasas de crecimiento pueden excesivamente decaer, como en nuestro caso, y la degradación no completarse adecuadamente, coincidiendo nuestros resultados con lo que reportan NÁPOLES y ÁBALOS (2011).

Lo reportado en cuanto a rendimiento de desarrollo de biomasa, los microorganismos del género *Pseudomonas* han seguido su metabolismo natural, mencionado líneas arriba, presentando mayor masa celular a concentraciones menores (60 y 100 ppm) en las cuales no se verifica una notable reducción del metal y contrariamente manifiestan una menor biomasa a concentraciones más altas de metal que si fueron reducidas considerablemente (NÁPOLES y ÁBALOS, 2011). Asimismo coincidiendo con HRYNKIEWICZ, *et al.* (2014), la *Pseudomonas* constituyen los microorganismos prometedores en la mejora de la biorremediación de los ambientes contaminados con cadmio.

El ajuste estadístico, como ANOVA y la prueba HSD de Tuckey refuerzan los resultados encontrados respecto a la eficiencia del 78,58 % de remoción o reducción, por medio de sistemas de biotransformación de microorganismos del género *Pseudomonas* desarrollados en biopelículas en biorreactores a nivel de laboratorio, actuando sobre concentración de Cd de 200 ppm.

VI. CONCLUSIONES

- Se seleccionaron, aislaron y adaptaron 3 géneros de bacterias resistentes al cadmio, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y un género de Actinomiceto.
- Se utilizó el género *Pseudomonas* desarrollado en biopelícula, para la determinación de la biotransformación de Cd por haber expresado mayor biodegradación del metal en la etapa de adaptación.
- Los parámetros de biotransformación del cadmio se establecieron entre 26 - 28 °C de temperatura, pH de 5 a 7 y una disminución en oxígeno disuelto, en 7 días de tiempo de retención para 800 ml de volumen de trabajo en el biorreactor.
- Se obtuvo mayor biomasa de células bacterianas a concentraciones menores (60 y 100 ppm) de Cd.
- En el biorreactor con 60 mg/L de Cd se presentó el mayor rendimiento de crecimiento en biomasa en biopelícula con respecto a los demás, con un porcentaje del 68,23 %.
- En el biorreactor con 200 mg/L de Cd se presentó la mayor eficiencia de biotransformación con respecto a los demás, con un porcentaje del 78,58 %.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar trabajos de investigación de biorremediación de suelos contaminados con cadmio, utilizando los otros géneros de microorganismos encontrados.
- Determinar la viabilidad del género *Pseudomonas* que pudiera ser utilizado en la biorremediación de suelos u otros ambientes contaminados con otros metales pesados.
- Establecer una metodología fija en base a la utilización de microorganismos propios de la zona que pueda aplicarse en la mitigación o quizás en la eliminación de la contaminación de suelos por metales pesados.

ABSTRACT

Raised biotransformed cadmium (Cd) by metabolic action of soil bacteria in biofilms developed air lift bioreactor, relating the environmental impact that cadmium in soils of Tingo María. An investigation was designed putting in operation 4 bioreactors air lift in batch culture (batch or batch) to different concentrations of Cd (60, 100, 200 and 300 mg / L) with 120 ml of seed culture and 680 ml of minimal medium nutrient salts such as uptime for 7 days. Soil samples of cacao extracted and taken to the laboratory to select the microorganisms, adapted to low concentrations of Cd (0.6, 1, 2 and 3 mg / L) selecting the microorganisms developed in the highest concentration. Temperature, pH, DO, biomass was determined; the final concentration of cadmium to λ of 228.8 nm, the efficiency of Biotransformation and biomass yield at baseline, at 3 days and when the operation of the bioreactor. The determinations were carried out in the Laboratory of Microbiology and Laboratory of Soils Universidad Nacional Agraria de la Selva. The results indicated that the biomass biofilm increased in lower concentrations (60 and 100 ppm Cd), raising the pH was evident, and there is a progressive decrease in the dissolved oxygen, nutrient and substrate (Cd), showing the highest percentage of efficiency biotransformation (78.58%) in the bioreactor 3 with 200 mg / L Cd and greater performance biomass in the bioreactor one (68.23%) whose treatment was 60 mg / L cadmium. It is concluded that since there is a decrease in pH (alkalinization) and the cadmium concentration in the starting microorganisms biotransformation cadmium being used as carbon and energy source by microorganisms.

Key words: Biotransformation, cadmium, bioreactor, biofilm microbial biomass.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, E.; CARRASCO, M.; LEÓN, O.; MARTÍNEZ, E.; SILVA, P.; *et al.*, 2005. Criterios de calidad de suelo agrícola. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile. 205 p
- ADENIJI, A. 2004. Bioremediation of Arsenic, Chromium, Lead, and Mercury. [En Línea]: (http://www.clu-in.org/download/studentpapers/bio_of_metals_paper.pdf., documento, 25 de junio de 2014)
- AGUAYO, P., 2005. Optimización de un sistema de tratamiento biológico de aire tipo airlift para la eliminación de vapores contaminados con hidrocarburos volátiles. Universidad Nacional de Temuco, Chile 23 p.
- AGUILAR, J., DORRONSORO, C., BELLVER, R., FERNÁNDEZ, E., FERNÁNDEZ, J., GARCÍA, I., IRIARTE, A., MARTÍN, F., ORTIZ, I., SIMÓN, M., 2003. Contaminación de los suelos tras el vertido tóxico de Aznalcóllar. Universidad de Granada-Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. España.
- ALLOWAY, B.J., STEINNES, E., 1999. Anthropogenic additions of cadmium to soils. En *Cadmium in Soils and Plants* (eds. McLaughlin, M.J. y Singh, B.R.), pp. 97-123. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- ANDERSON O, NIELSEN JB, NORDBERG GF., 1992. Factors affecting the intestinal uptake of cadmium from diet. In: *Cadmium in the human*

- environment: Toxicity and carcinogenicity., IARC Scientific Publications N° 118. 173-187 p.
- BADILLO J., 1989. Curso de Toxicología Ambiental; Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. 70-265 p.
- BAILON, L., CRUZ, G., CERVANTES, A., 2003. Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, México 54 p.
- BALLERINI, D. ; GATELLIER, C. ; VOGEL, T.. 1998. Techniques de traitement par voie biologique de sols pollués. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie. Angers, Franci. 248 p.
- BLENKLE, F. SMERT, D. 2002. Biotransformación de aromaticos Hidrocarburos. Material para distribución y de estudios. Biodegradación & Bioremediación. CE 320-01.Chile-Santiago. 16 p.
- BRADSHAW L., 2000. Microbiología del laboratorio. Edit. El Manual Moderno S.A., México D.F., México. 235 p.
- CARDENAS, A., 2012. Presencia de cadmio en algunas parcelas de cacao orgánico de la cooperativa Agraria Industrial Naranjillo, Tingo María, Perú. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Huánuco, Perú. 96 p.
- CERVANTES C., ESPINO A., ACEVEDO F., LEON I., RIVERA M., AVILA M., WROBEL K., GUTIERREZ J., RODRIGUEZ J., MORENO R.; 2006. Interacciones Microbianas con Metales Pesados. 48(2): 203 – 210 p.
- CHANMUGATHAS, P. y BOLLAG, J., 1987. Microbial role in immobilization and subsequent mobilization of cadmium in soil suspensions. Soil Science

- Society of American Journal 51(5): 1184-1191 p.
- CHENG, G. y LI, X. 2009. Bioreduction of Chromium (VI) by *Bacillus sp.* Isolated from Soils of Iron Mineral Area. *European Journal of Soil Biology*. 45 (5-6): 483-487 p.
- CHRISTENSEN, T.H., HAUNG, P.M., 1999. Solid phase cadmium and the reactions of aqueous cadmium with soil surfaces. En: *Cadmium in Soils and Plants* (eds. McLaughlin, M.J. y Singh, B.R.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 65-96 p.
- COYNE M. y RASKIN M., 2000. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Editorial Paraninfo S.A. 416 p.
- CLAUSEN, C.A. 2000. Isolating metal-tolerant bacteria capable of removing copper, chromium, and arsenic from treated wood. *Waste Manage Resource*. 18(1): 264-268 p.
- EDWARDS, S., SCHROEDER, CHANG, D., MORTON, R., 2002. Control of volatile organic compound emissions using a compost biofilter. *Biotechnology and Water Environmental Research*. 316 – 321 p.
- ERNST, W.H.O., 1990. Mine vegetation in Europe. En: *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects* (Shaw, A.J. Ed). Crc Press, Boca Raton, Florida 21-37 p.
- FRIBERG L, PISCATOR M., 1974. *Cadmium in the environment*. 2nd ed., CRC Press, Cleveland, Ohio. 248 p.
- GAO, J., PAN, H., XIAO, T., BARBIER, G., WANG, Z., YUE, H., SUN, S., NITSCHKE, S., BERNADAC, A., PRADEL, N., WU, L.F. 2006. Isolation and characterization of novel marine *Roseobacter* clade members

producing unique intracellular chromium-rich aggregates: Article in press. Research in Microbiology. 1-6. Vol 9. Issue 11. Editor: Yiguo Hong, CAS, China. 8 p. [En Línea]: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16843644>, documento, 30 julio. 2014).

- GARCÍA O., PÉREZ M., RIBAS B.; 2002. Electroforesis Capilar de metalotioneína en hígado de mamífero como proteína bioindicadora de la contaminación ambiental por cadmio y plomo. En Globalización Ambiental. Perspectivas Agro-sanitarias Urbanas. 747-755 p.
- GARRITY G., BRENNER D., KRIEG N. y STALEY J., 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol II. The Protobacteria, Springer-Verlag. New York, USA.
- GARZA GONZÁLEZ M., 2005. Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover pb(ii), cr(vi), cd(ii), cu(ii), zn(ii) y ni(ii). Tesis para el grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, La Habana. Universidad de la Habana – Facultad de biología. 37 p.
- HARRISON, J.J., CERI, H., ROPER, N.J., BADRY, E.A., SPROULE, K.M., TURNER, R.J. 2005. Persisten cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. Microbiology. 151 (10): 3181–3195 p.
- HUAMANI H., HUAUYA M., MANSILLA L., FLORIDA N., Y NEIRA G., 2012. Presencia de metales pesados en cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*) orgánico. Tingo Maria. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 6 p.
- HRYNKIEWICZ K, ZŁOCH M, KOWALKOWSKI T, BAUM C, NIEDOJADŁO K, BUSZEWSKI B., 2014. Strain-specific bioaccumulation and intracellular distribution of Cd²⁺ in bacteria isolated from the rhizosphere,

- ectomycorrhizae, and fruitbodies of ectomycorrhizal fungi. Springer. Vol 1. 13 p [En Línea]: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4315882/>, documento, 25 julio. 2014).
- KLEIN D., 1972. Mercury and Other Metals in Urban Soils. In BOUDENE, 1979. Proceedings of the Research Seminar.
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I., NEI, M., 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17(12): 1244-1245 p.
- LASAT MM, 2002. Reviews and Analyses: Phytoextraction of Toxic Metals - A Review of Biological Mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31(1): 109-120 p.
- LÓPEZ, C., 1998. Transformación de tetracloro etano (TcCA) por biopelículas metilotróficas. Tesis Maestría en Biotecnología y Bioingeniería, Trujillo, Escuela de Postgrado, Universidad Nacional de Trujillo.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. 2004. Diversidad metabólica. En: *Biología de los Microorganismos*. Décima edición. España. Pearson Educación, S.A. 557-567 p.
- MARTÍNEZ, R.J., WANG, Y. RAIMONDO, M.A., COOMBS, J.M., BARKAY, T., SOBECKY, A. 2006. Horizontal Gene transfer of PIB- Type ATPases among Bacteria Isolated from Radionucleotide- and Metal-Contaminated Subsurface Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(5): 3111-3118 p.
- MCALLISTER, C. B., GARCIA-ROMERA, I., MARTIN, J., GODEAS, A., & OCAMPO, J. A., 1995. Interaction between *Aspergillus niger* van Tiegh. And *Glomus mosseae*. (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. *New Phytologist*.

129(2): 309-316 p.

MCCULLOUGH J, HAZEN T, BENSON S, METTING F, PALMISANO A., 1999.

Bioremediation of metals and radionucleids. [En Linea]: (<http://www.escholarship.org/uc/item/8s57v0cs?display=all>, documento, 25 julio. 2014)

MCLAUGHLIN, M.J., SINGH, B.R., 1999. *Cadmium in Soils and Plants*. Kluwer published by Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. Cap 10. 271 p.

MIJARES M.A.P., 2003. Aislamiento y caracterización de bacterias con capacidad para inmovilizar cadmio. Tesis de Licenciatura en Biología en el área de Biotecnología. Universidad de las Américas, Puebla, México. 97 p.

MIRANDA, H., ROBLES, H., VILLANUEVA, L., RODRIGUEZ, C., 2006. *Biorreactores Diseño y Aplicación*, Sociedad Peruana de Biotecnología. Trujillo, Perú 86 p.

NÁPOLES Á., J, y ÁVALOS R., A. 2011. *Biorremediación de ecosistemas contaminados con xenobióticos*. Centro de estudios de biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Oriente. Santiago de Cuba. 46 p.

NOGAWA K, HONDA R, KIDO T, TSURITANI Y, YAMADA Y, ISHIZAK M, YAMAYA H (1989). A dose response análisis of cadmium in general environment with special reference to total cadmium intake limit. *Environ Res* 78(1): 7-16 p.

NORVELL, W.A., WU, J., HOPKINS, D.G., WELCH, R., 2000. Association of

cadmium in durum wheat grain with soil chlorine and chelate-extractable soil cadmium. *Soil Science Society of America Journal* 64(1):2162-2168 p.

OLIVE S., OOZAWA Y., HIRATIA K. AND WATANBE Y., 2002. Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilm and reactor performance at various C:N ratios. *Wat. Sci. Technol.* 35 (6): 91 – 99 p.

PARK, C.H., KEYHAN, M., WIELINGA, B., FENDORF, S., MATIN, A. 2000. Purification to Homogeneity and Characterization of a Novel *Pseudomonas putida* Chromate Reductase. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(5): 1788–1795 p.

PISCATOR M., 1985. Dietary Exposure to Cadmium and Health Effects: Impact of Environmental Changes. *Environ Health Persp* 63(1): 127 – 132 p.

PRINCE, W.S.P.M., KUMAR, S.P., DOBERSCHUTZ, K.D., SUBBURAM, V., 2002. Cadmium toxicity in mulberry plants with special reference to the nutritional quality of leaves. *Journal of Plant Nutrition* 25(4):689-700 p.

QUIROZ, E.: 2003. Montaje y puesta en marcha del sistema tipo Ailift para el tratamiento de gases contaminados con hidrocarburos volátiles., Tesis para optar al título de Ingeniero Ambiental, Universidad Católica de Temuco, Facultad de Ciencias Básicas, Temuco. 12 p.

RATHOR A. y ALVAREZ-COHEN, L. 2003. Aerobic biotransformation of Gasoline Aromatics in MultiComponent Mixtures, *Bioremediation J.* 4(2): 171-179 p.

RIVAS B.G. A., GUTIÉRREZ S. Y MERINO F., 2004. Biorremoción de metales pesados en solución por *Pseudomonas fluorescens* M1A–4S aisladas de

- ambientes mineros. En: Segunda Semana de Ciencia y Tecnología II–SCT–2004. Asociación Chotana de Ciencias. Perú. 24(1): 14-15.
- ROHLEDER H., and KORTE F., 1982. Ecotoxicología Aspects of Cadmium INDEN 5(1): 1-4 p.
- SALDIVAR L., TOVAR A., NAMIHIRA D.; 1997 Contaminantes inorgánicos. Capítulo 13 – Cadmio. BVSDE. 16 p.
- SCRAAG, A. 2001. Biotecnología para ingeniero. Edit. Acribia S.A., Zaragoza, España. 307 p.
- SCRAAG, A. 2002. Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos. México. Ed: Limusa. 410 p.
- SHAH, A., HASAN, F., HAMEEA, A., AHMEDT, S., 2009. Biotechnology Advances Suplemento: Rev. Latino América. Metal.Mater. 2008; 147 – 148 p.
- SHIBAMOTO T AND BJELDANES LF, 1993. Introduction to Food Toxicology. Academic Press, INC, San Diego, California, 136-139 p.
- SHULER M. y KARGI F., 2002. Bioprocess Engineering. Basic concepts. Prentice Hall Int. Series 2nd Edition Washington D.C., USA. 533 p.
- SINHA S.; KUMAR S., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* KUCD1, un posible candidato para la remediación e cadmio. 40(3): 62-655p. [En Línea]: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24031411>, documento, 30 de julio 2014).
- SOLANAS, A., 2009. Biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación d suelos. Universidad de Barcelona, Vol. IX. Barcelona España. 8 p.

- STEWART, P.S. 2003. Diffusion in Biofilms. *Journal of Bacteriology*. 185(5): 1485–1491 p.
- TAKE M., SHAIKH T., MANE N., MAJUNDER D., 2012. Biorremediation of Xenobiotics: Use of dead fungal biomass as biosorbent. *India* 3(1): 5 p.
- USEPA, 1994. Methods for the determination of Metals in Environmental Samples.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTIVE AGENCY, 1994: "Method 1312. synthetic precipitation leaching procedure" CD-ROM. 25p.
- VAN CAUWENBERGHE Y ROOTE, 1998. Technology Overview reports *in situ*. Bioremediation. [En Línea]: (<http://www.gwrtac.org>, documento, 02 agosto 2014)
- VERGARA, A. O.; ALARCÓN, N. A.; AROCA, G. E., Y LARA L. 2005. Effects of Gas Flow Rate, Inlet Concentration and Temperature. 93(2): 9-165 p. [En Línea]: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233182>, documento, 20 julio 2014).
- VERMA, T., GARG, S.K., RAMTEKE, P.W. 2009. Genetic correlation between chromium resistance and reduction in *Bacillus brevis* isolated from tannery effluent. *Journal of Applied Microbiology*. 107 (5): 1425-1432 p.
- VOLESKY, B., 1999. Biosorption for the next century. Chemical Engineering Department. Mc Gill University, Canadá. 14 p.
- VOS G, HOVENS JP, DELFT WV, 1987. Arsenic, cadmium, lead and mercury in meta, livers and kidneys of cattles slaughtered in The Netherlands during 1980-85. *Food Addit Contam* 4(1): 73 – 88 p.

VULLO, D.L. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva* 2(3): 6 p.

WHO 1979. Environmental health criteria for cadmium. Interior report. Geneva:World Health Organization Rep. EHE/EHC/79, 20 p.

ZURERA-COSANO G., 1993. Cadmium: properties and determination. En: *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ, eds., Academic Press Ltd, London, 557 – 561 p.

X. ANEXO

Apéndice 1. Aislamiento, selección y elección de bacterias.

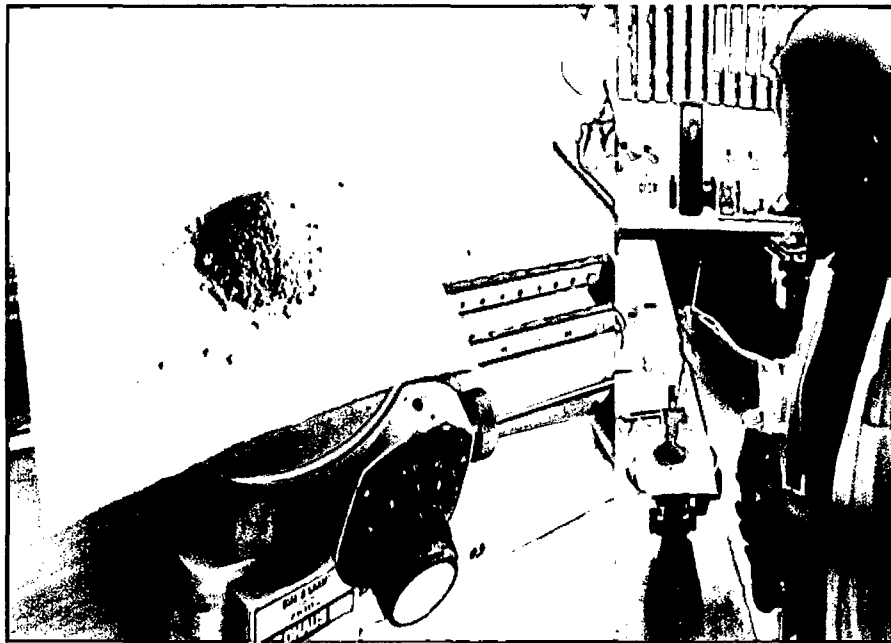


Figura 1. Pesado de 10gr de muestra de suelo



Figura 2. Se agregó los 10gr a un matraz con 90 ml de caldo peptona.



Figura 3. Filtrado de la mezcla (suelo + caldo peptona).



Figura 4. Se agregó 10ml del filtrado a 90 ml de BHI, posteriormente se incubo por 24 horas a una temperatura de 37 °C.

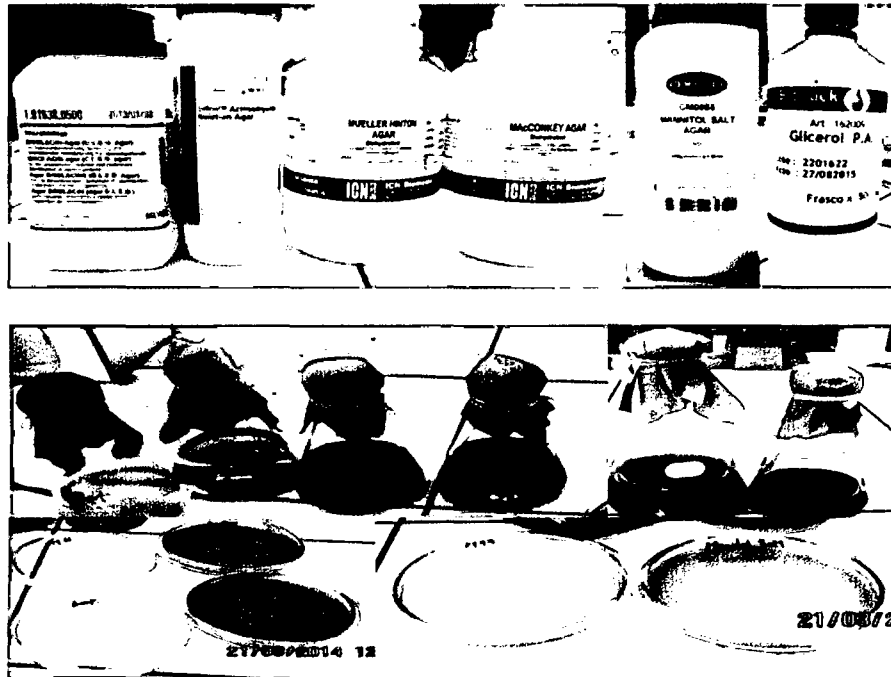


Figura 5. Medios de cultivo para la identificación de microorganismos



Figura 6. Preparación de los diferentes medios de cultivo: se preparó 100ml de cada medio, al medio actinomiceto se le agregó 1ml de glicerol. Se llevó a baño maría por unos 30 minutos, y luego a la autoclave a 121 ° C a 15lbs/pulg² por 15 minutos.



Figura 7. Preparación de los diferentes medios de cultivo: se dejó que enfriar los medios hasta una temperatura de 45 ° C aproximadamente y luego se agregaron a placas Petri.

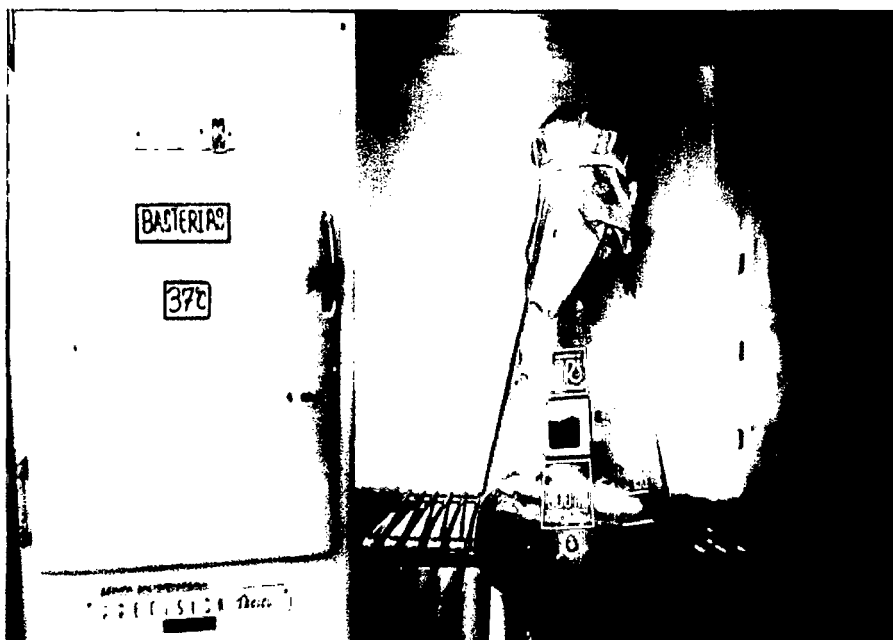


Figura 8. Después de 48 horas de incubación a 37 ° C se observó el crecimiento de microorganismos del suelo en caldo BHI.

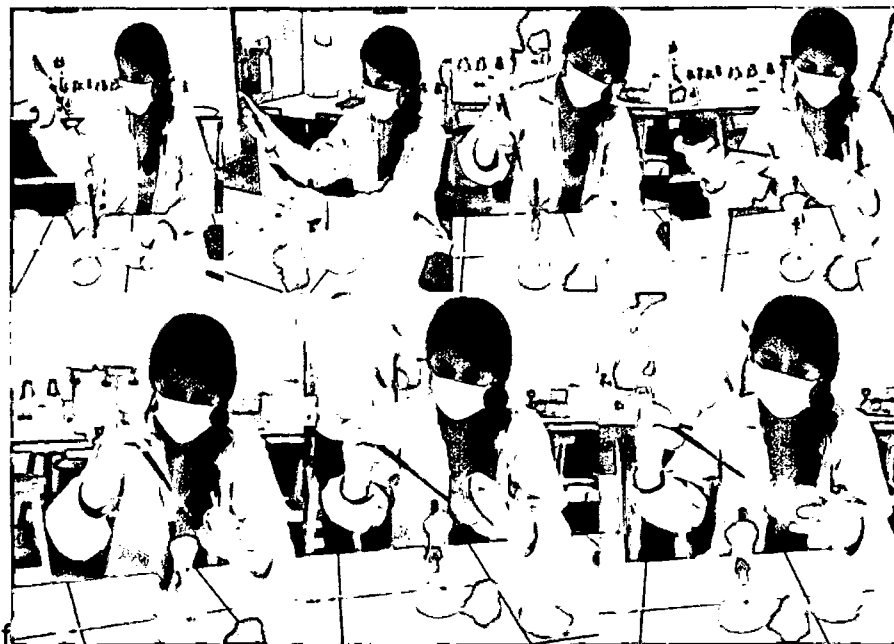


Figura 9. Repicado de microorganismos crecidos en caldo BHI, por el método de estrías en placas con 20mL en los diferentes medios.

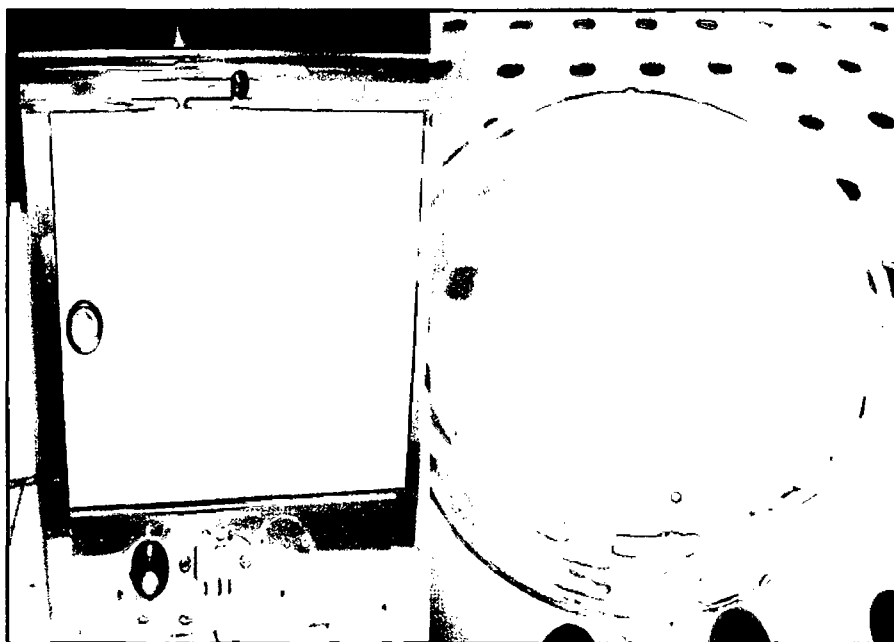


Figura10. Medio M77 se incubo 48 horas a temperatura ambiente

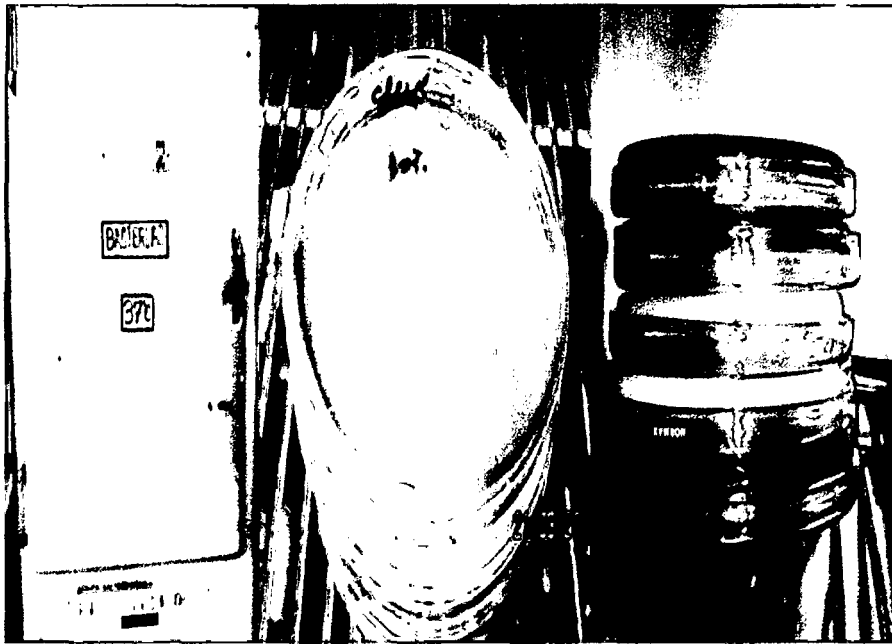


Figura 11. Medio Muller Hilton (MH), medio CLED, medio Mac conkey y medio Manitol se incubaron 48 horas a temperatura de 37 °C. Medio Actinomicetos, incubo por 4 días a temperatura de 37 °C.

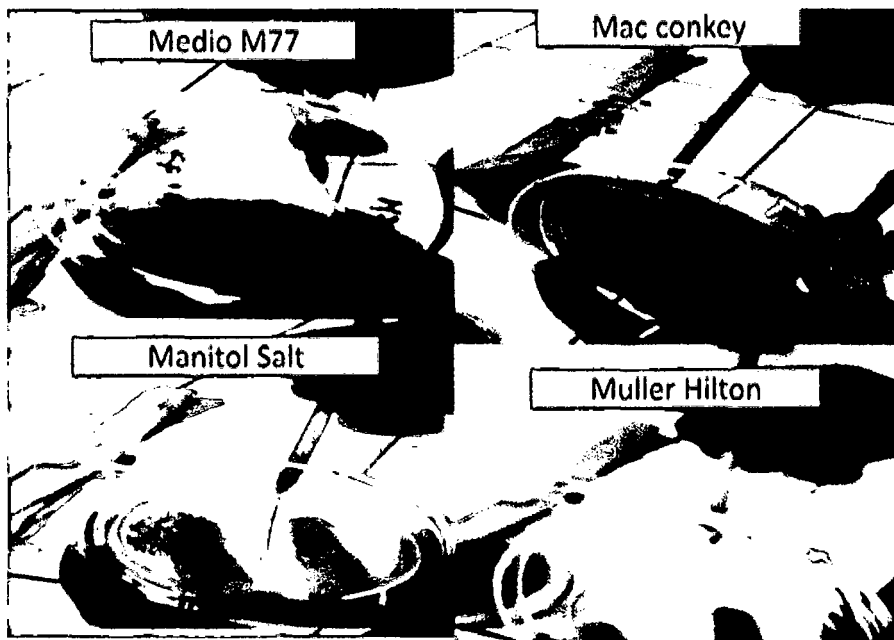


Figura 12. Se repicó los microorganismos desarrollados en los diferentes medios en un matraz con 100ml de BHI, se llevó a incubación por 48 horas a temperatura de 37°C.



Figura 13. Después de 48 horas de incubación, se repicaron las colonias desarrolladas en BHI a cuatro (4) tubos de ensayo con medio Muller Hilton (plano inclinado) se llevó a incubación por 48 horas a temperatura de 37°C, las colonias desarrolladas en los tubos de ensayo se llevaron a refrigeración para su posterior uso.

Apéndice 2. Etapa de adaptación – selección de bacterias en biopelículas



Figura 1. Activación de microorganismos: las colonias mantenidas en refrigeración se repicaron por enjuague en 100 ml de caldo BHI, se incubaron por 48hrs a temperatura de 37°C.



Figura 2. Adaptación de microorganismos eficientes: pesado del contaminante; placas Petri con medio mínimo de sales y contaminante a diferentes concentraciones.

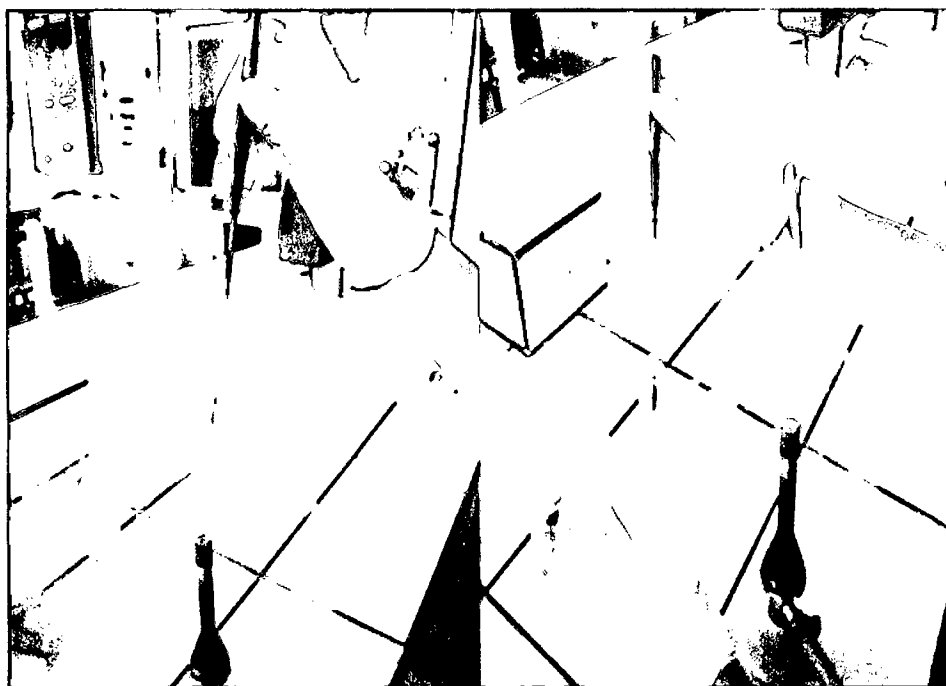


Figura 3. Se repico el contenido de las colonias del caldo BHI sobre placas con 20ml de Agar Mínimo De Sales Minerales adicionado con concentraciones bajas (0.6ppm, 1ppn, 2ppm y 3ppm) de cadmio. Se llevó a incubación por 48hrs a 37°C



Figura 4. Las colonias crecidas y adaptadas en la más alta concentración de cadmio se repicaron en BHI se llevó a incubación por 48hrs a temperatura de 37°C y se mantuvo en refrigeración hasta la operación en los biorreactores.

Apéndice 3. Preparación de birreactores air lift



Figura 1. Cámara de cultivo cilíndrica de vidrio de 100mm de diámetro de 200mm de altura.

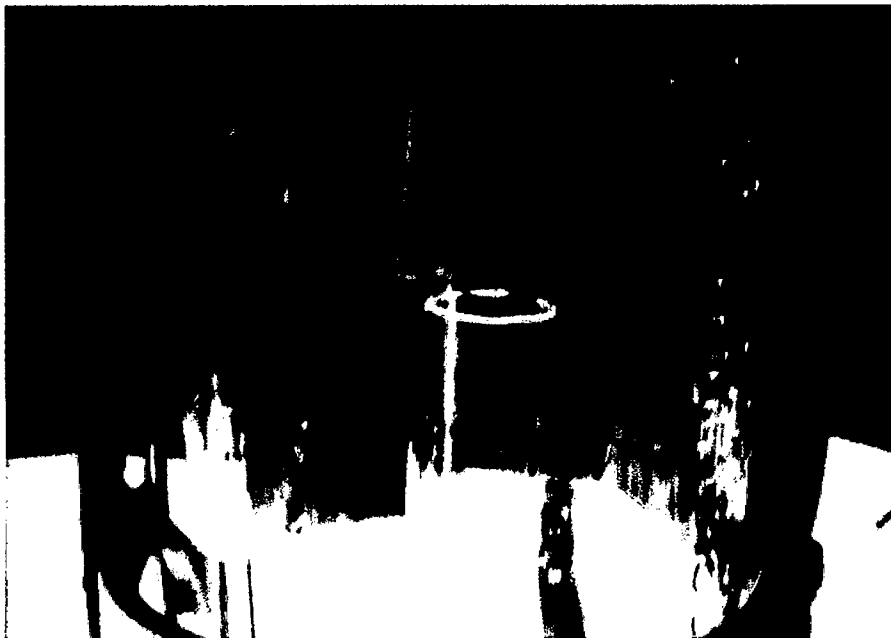


Figura 2. Tubo deflector o de distribución central de 80 por 28 mm



Figura 3. Frascos de vidrio de 500 ml con solución saturada de NaCl (350ml) como filtros para aire.

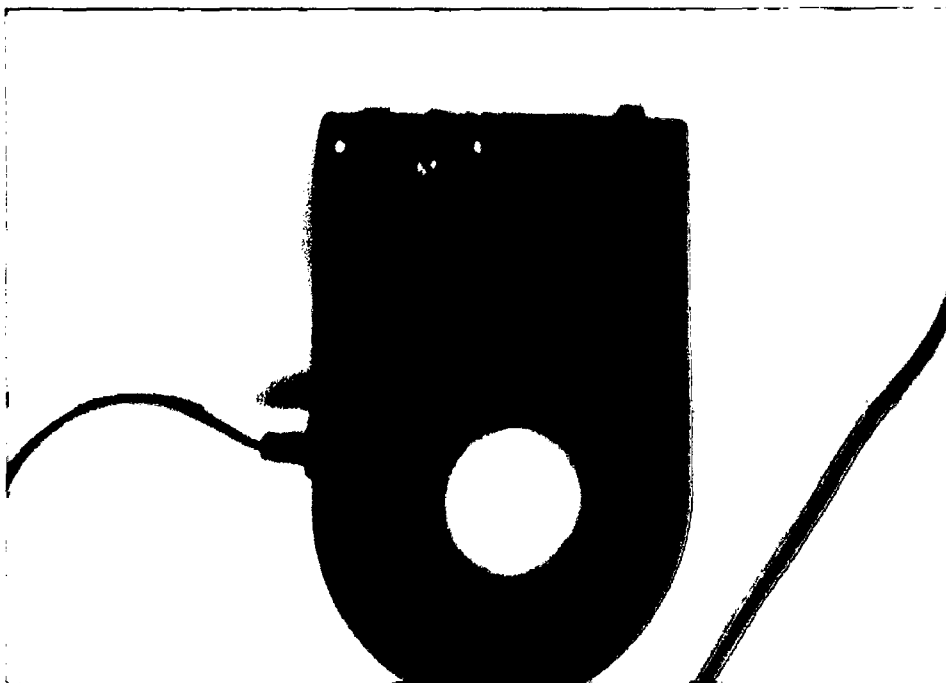


Figura 4. Bomba de aire de doble salida (ELITE 802).

Apéndice 4. Equipos utilizados para la toma de datos.



Figura 1. pHmetro debidamente calibrado marca EXTECH de modelo 47227

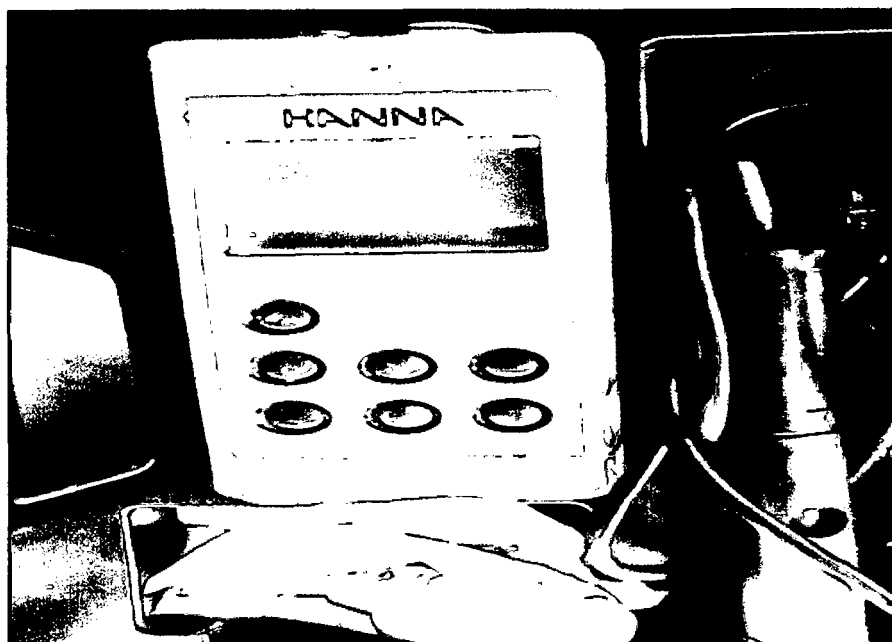


Figura 2. Oxímetro de marca HANNA de modelo HI 9146 debidamente calibrado

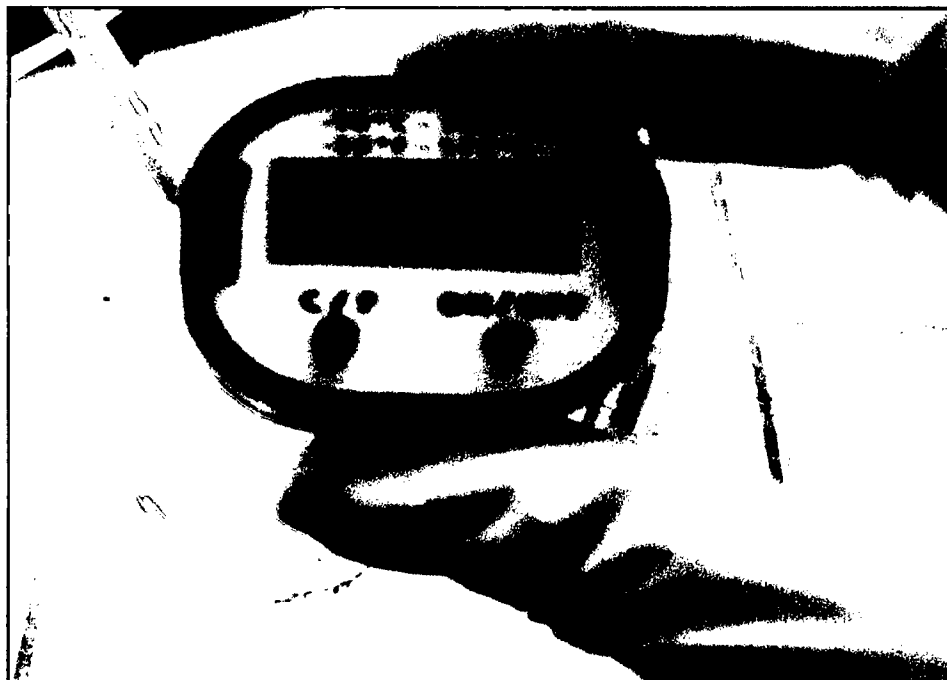


Figura 3. Termómetro ambiental calibrado (ROAST) modelo JR - 5.

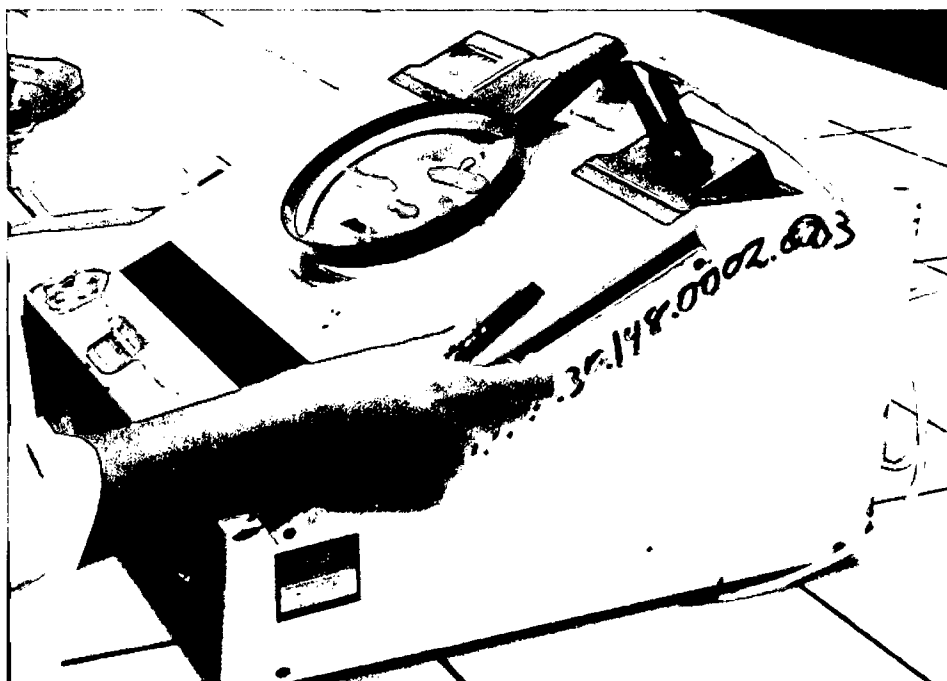


Figura 4. Cuenta Colonias Digital. Marca Numak, MODELO J-2.

Apéndice 5. Resultados



Figura 1. Crecimiento de microorganismos adaptados a diferentes concentraciones del contaminante.

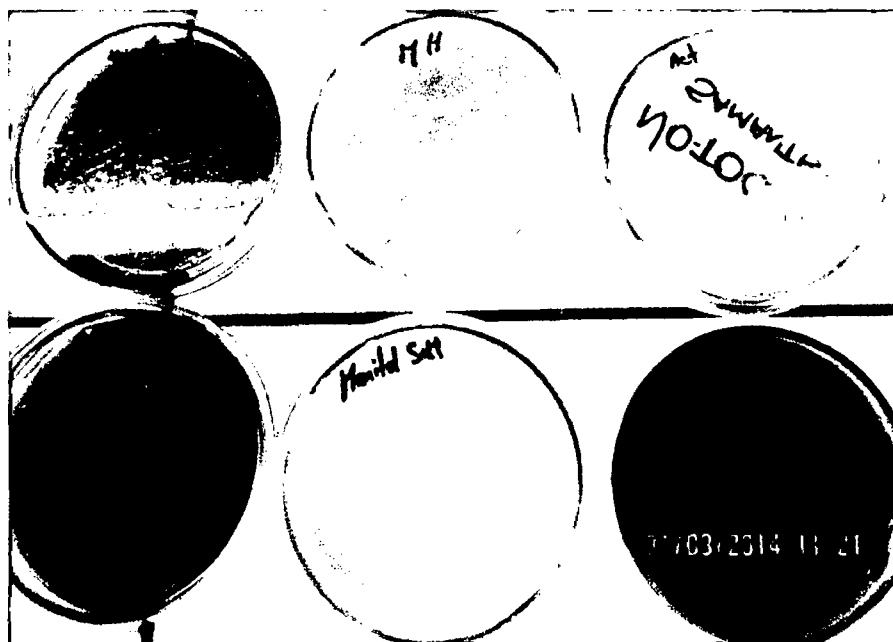


Figura 2. Identificación de colonias más eficientes desarrolladas en diferentes medios para la Biotransformación de cadmio.



Figura 3. Se desarrollaron *Pseudomonas* en el Medio M77.

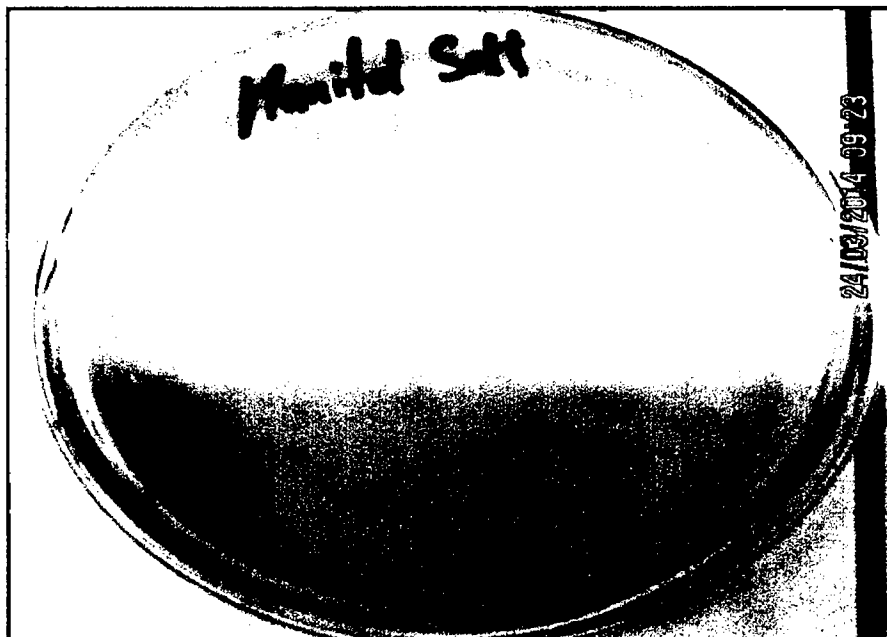


Figura 4. Se desarrollaron *Estafilococos* en el Medio Manitol Salt.



Figura 5. En los medios Muller Hilton (MH), CLED y Mac conkey se desarrollaron *Pseudomonas*



Figura 6. Se desarrollaron *Actinomicetos* en el Medio Actinomicetos

Apéndice 6. Operación del biorreactor y toma de datos

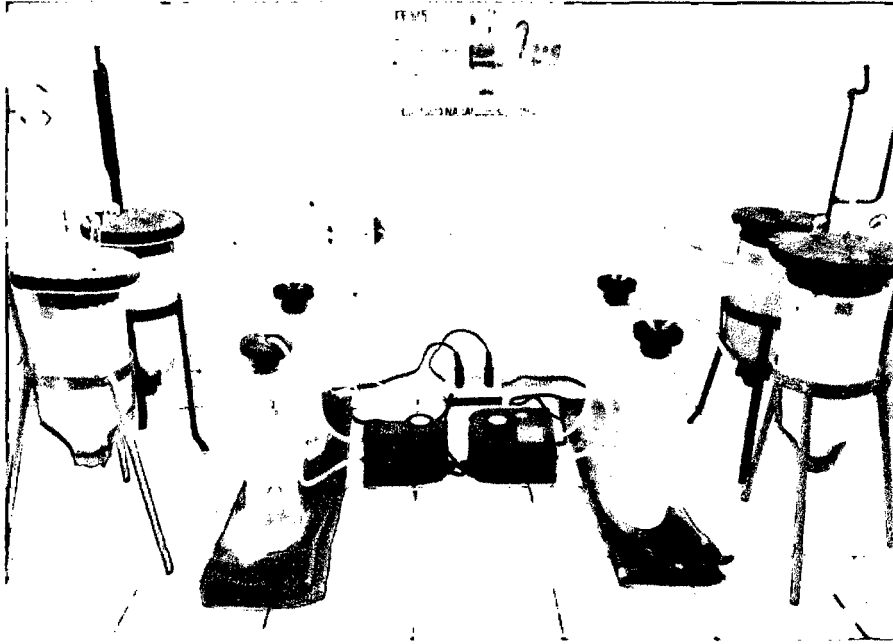


Figura 1. Operación del sistema.



Figura 2. Extracción de la muestra para la toma de datos.

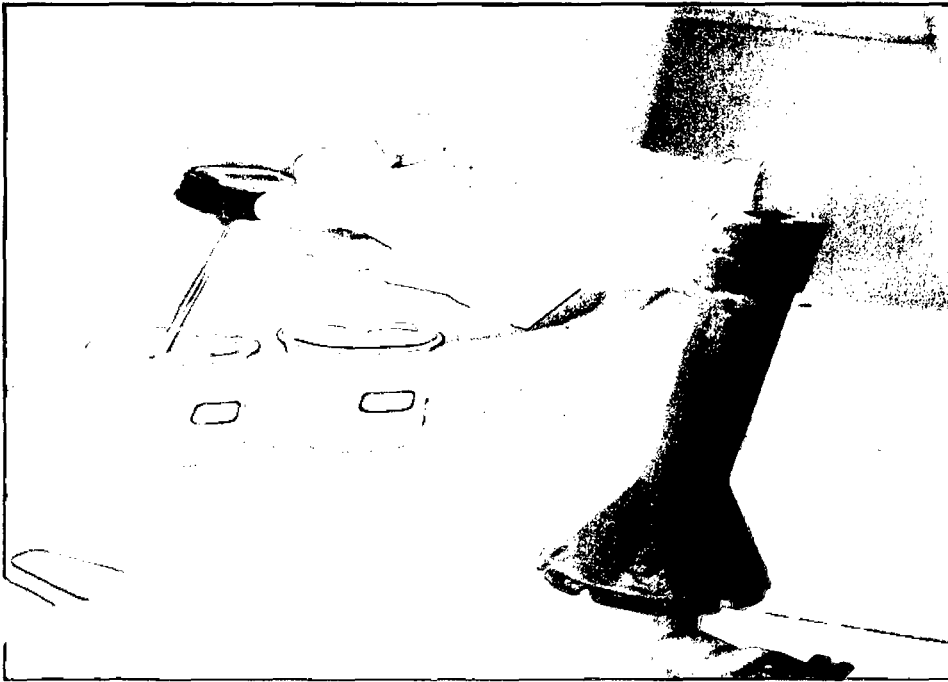


Figura 3. Toma de la temperatura.



Figura 4. Toma del oxígeno disuelto.

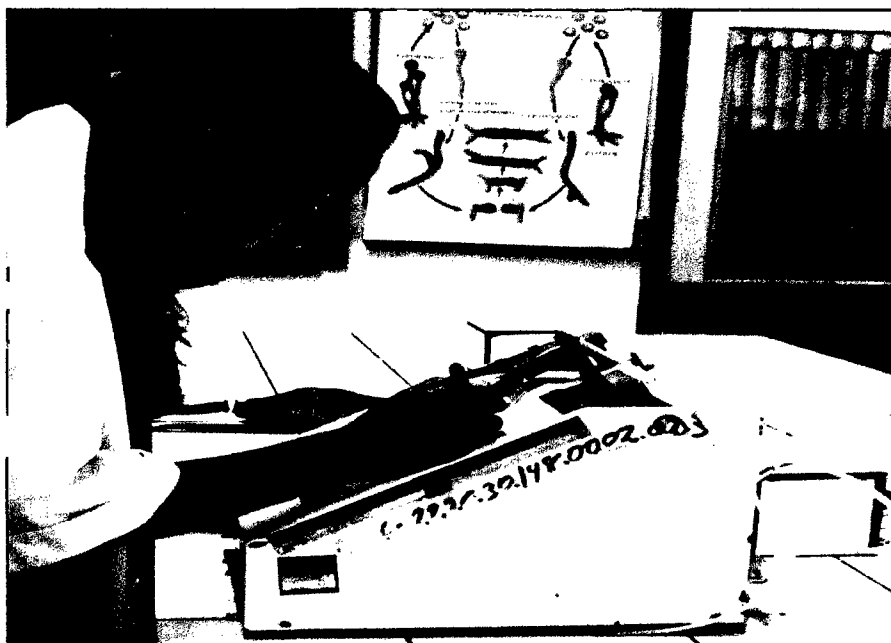


Figura 5. Recuento de colonias.

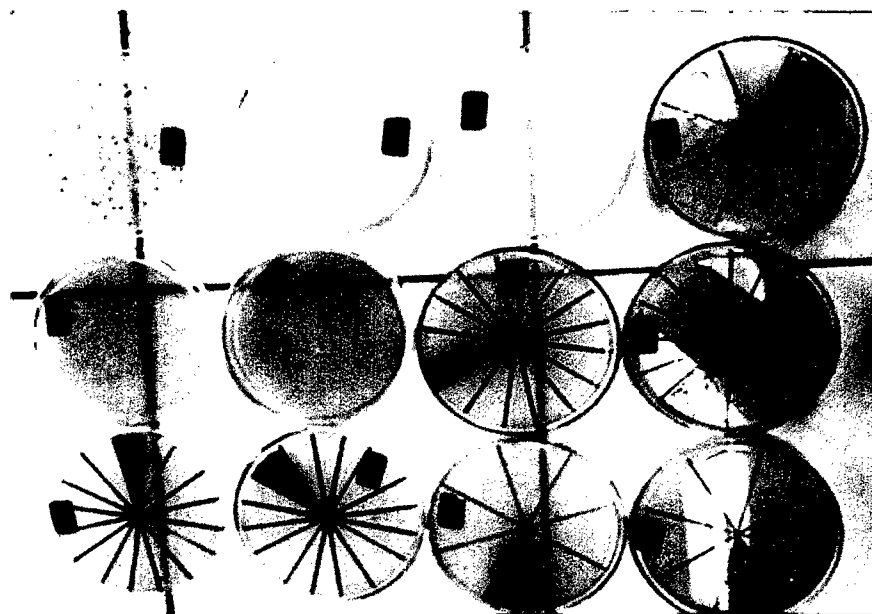


Figura 6. Placas donde se realizó el recuento de colonias.