

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGIA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Efecto de la temperatura en la bioacumulación de cadmio, mediante un cultivo batch, utilizando *Pseudomonas putida* aislada de efluentes mineros vertidos en la cuenca del valle de Chuquicara.

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGIA**

AUTORES:

Bach. Bartolo Paredes, Yomira Pamela

Bach. Calderón Cárdenas, Jason David

ASESOR:

Ms. Villanueva Carlos, José Manuel

ID ORCID: 0000-0002-5056-0001

NUEVO CHIMBOTE- PERU

2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGIA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Efecto de la temperatura en la bioacumulación de cadmio, mediante un cultivo batch, utilizando *Pseudomonas putida* aislada de efluentes mineros vertidos en la cuenca del valle de Chuquicara.

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGIA**

Revisado y Aprobado por el Asesor:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'José Manuel Villanueva Carlos', is written over a horizontal line.

Ms. Villanueva Carlos, José Manuel

DNI: 32733772

ID ORCID: 0000-0002-5056-0001

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGIA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Efecto de la temperatura en la bioacumulación de cadmio, mediante un cultivo batch, utilizando *Pseudomonas putida* aislada de efluentes mineros vertidos en la cuenca del valle de Chuquicara.

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGIA**

Revisado y aprobado por el Jurado Evaluador:

M. Sc. Lecca Zavaleta, Víctor Eduardo
PRESIDENTE

DNI: 42636735
ID ORCID: 0000-0002-3759-8128

M. Sc. Espejo Vargas, Linda Eddy
SECRETARIO

DNI: 32934438
ID ORCID: 0000-0001-8175-3941

Ms. Villanueva Carlos, José Manuel
INTEGRANTE

DNI: 32733772
ID ORCID: 0000-0002-5056-0001

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Auditorio de la Facultad de Ciencias, siendo las 12:00 horas del día 19 de julio del 2024, dando cumplimiento a la Resolución N° 101-2024-UNS-CFC, se reunió el Jurado Evaluador presidido por el Ms.C. Víctor Eduardo Lecca Zavaleta, teniendo como miembros a la Ms.C. Linda Eddy Espejo Vargas (secretaria) y al Ms.C. José Manuel Villanueva Carlos (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de **Licenciado en Biotecnología**, realizado por los tesisistas **Br. Yomira Pamela Bartolo Paredes** y **Br. Jason David Calderón Cárdenas**, quienes sustentaron la tesis intitulada: **"Efecto de la temperatura en la bioacumulación de cadmio, mediante un cultivo batch, utilizando *Pseudomonas putida* aislada de efluentes mineros vertidos en la cuenca del valle de Chuquicara"**.


Terminada la sustentación, la tesista respondió a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **APROBADA**, asignándole un calificativo de **18 puntos**, según artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS).

Siendo las 12:49 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad.



Ms.C. Víctor Eduardo Lecca Zavaleta
Presidente



Ms.C. Linda E. Espejo Vargas
Secretario



Ms.C. José Manuel Villanueva Carlos
Integrante



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Jose Villanueva
Título del ejercicio: TESIS 2024
Título de la entrega: Efecto de la temperatura en la bioacumulación de cadmio, ...
Nombre del archivo: Bioacumulacion_cd_-_Calderon_y_Bartolo_INFORME_FINAL.pdf
Tamaño del archivo: 1.03M
Total páginas: 68
Total de palabras: 17,285
Total de caracteres: 88,096
Fecha de entrega: 02-ago.-2024 08:23p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega... 2413904895

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGIA



Efecto de la temperatura en la bioacumulación de cadmio, mediante un cultivo batch, utilizando *Pseudomonas putida* aisladas de efluentes mineros vertidos en la cuenca del valle de Chuquicara.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGIA

AUTORES:

Bach. Bartolo Paredes Yomira Pamela
Bach. Calderón Cárdenas Jason David

ASESOR:

Ms. Villanueva Carlos, José Manuel

NUEVO CHIMBOTE- PERU
2024

Efecto de la temperatura en la bioacumulación de cadmio, mediante un cultivo batch, utilizado Pseudomonas putida aisladas de efluentes mineros vertidos en la cuenca del valle de Chuquicara.

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.ucss.edu.pe Fuente de Internet	4%
2	aprenderly.com Fuente de Internet	2%
3	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	balcon.mag.gob.ec Fuente de Internet	1%
5	faolex.fao.org Fuente de Internet	1%
6	www.geocities.ws Fuente de Internet	1%
7	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
8	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	<1%

DEDICATORIA

A Dios,

*A nuestros padres; por impulsarnos
a salir adelante, por estar a nuestro
lado dando calidez y amor, por ser
nuestro motor de vida.*

*A nuestros hermanos, por su aliento
y su inmenso cariño durante los
años universitarios.*

A nuestros angelitos en el cielo.

Yomira & Jason

AGRADECIMIENTO

A nuestro asesor, Ms. José Villanueva Carlos por su apoyo incondicional y guía en nuestra etapa académica, por su constante acompañamiento en el desarrollo del presente trabajo.

Yomira & Jason

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Descripción y formulación del problema.....	1
1.2.	Objetivos.....	2
1.3.	Formulación de la hipótesis.....	3
1.4.	Justificación e Importancia.....	3
II.	MARCO TEORICO.....	4
2.1.	Antecedentes.....	4
2.2.	Marco Conceptual.....	8
III.	MATERIALES Y METODOS.....	17
3.1.	Medios de cultivo.....	17
3.2.	Prueba de resistencia al cadmio usando Cloruro de Cadmio (CdCl ₂).....	17
3.3.	Prueba de bioacumulación (células vivas) vs bioadsorción (células muertas) con <i>Pseudomonas putida</i>	18
3.3.1.	Bioacumulación (células vivas).....	18
3.3.2.	Bioadsorción (Células muertas).....	18
3.4.	Toma de muestra del río.....	19
3.5.	La muestra.....	20
3.6.	Tratamiento de bioacumulación a 25°C.....	20
3.7.	Tratamiento de bioacumulación a 30°C.....	21
3.8.	Método de peso seco.....	21
3.9.	Curva de calibrado para DNS.....	22
3.10.	Determinación de azúcares reductores.....	23
3.11.	Curva de calibrado para concentración proteica (Bradford).....	23
3.12.	Determinación de concentración proteica (Bradford).....	23
3.12.1.	Ruptura celular (Choque Osmótico).....	23
3.12.2.	Método de Bradford.....	24
3.13.	Método de modelamiento matemático con Monod.....	24
3.14.	Método para neutralizar el Cadmio.....	25
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	26
4.1.	Prueba de Resistencia al Cadmio.....	26
4.1.1.	Prueba de bioacumulación vs adsorción.....	28
4.1.2.	Toma de muestra para tratamientos.....	31
4.1.3.	Tratamiento de bioacumulación 25°C.....	32

4.1.4.	Tratamiento de bioacumulación a 30°C	34
4.1.5.	Resultados de análisis de bioacumulación	36
4.1.6.	Análisis Estadístico	37
4.1.7.	Determinación de concentración proteica	39
4.1.8.	Neutralización de cadmio	41
V.	CONCLUSIONES.....	42
VI.	RECOMENDACIONES	43
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44
VIII.	ANEXOS	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cinética de crecimiento microbiano de <i>P. putida</i> durante las primeras 30 h..	28
Tabla 2: Datos de biomasa seca para la prueba de adsorción.....	29
Tabla 3: Datos de concentración de cadmio del tratamiento de Bioacumulación vs Adsorción	30
Tabla 4: Información relevante del muestreo de agua del río en los puntos N° 1 y 2...	31
Tabla 5: Datos de biomasa y sustrato del caldo nutritivo que contiene <i>P. putida</i> durante 312 h, en el tratamiento a 25°C	32
Tabla 6: Datos obtenidos para la cinética de Monod del tratamiento a 25°C	33
Tabla 7: Datos de biomasa y sustrato del caldo nutritivo que contiene <i>P. putida</i> durante 312 h, en el tratamiento a 30°C	34
Tabla 8: Datos obtenidos para la cinética de Monod a 30°C.....	34
Tabla 9: Resultados obtenidos de la bioacumulación de cadmio de ambos tratamientos.	36
Tabla 10: Concentración inicial y final de cadmio en cada tratamiento, más el porcentaje de eficiencia de bioacumulación de cadmio en cada tratamiento.....	36
Tabla 11. Datos estadísticos del análisis de resultados de la bioacumulación de cadmio de los tratamientos: control, 25°C y 30 °C a la hora 288 de los tratamientos.....	37
Tabla 12. Datos de máximos y mínimos de concentración de cadmio, de los tratamientos de bioacumulación de cadmio a 25°C, 30°C y control a la hora 288	37
Tabla 13. ANOVA del diseño factorial de los tratamientos de bioacumulación de cadmio: temperatura ambiente, 25°C y 30 °C, a la hora 288	38
Tabla 14: Solución de Bradford para la curva de calibrado de concentración proteica.	39
Tabla 15: Concentración de proteína en los tratamientos de 25° y 30°C.....	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Resistencia al Cd ²⁺ de bacterias. Entrada y salida de cadmio en una célula	13
Figura 2: Ilustración del mecanismo de Bioacumulación.	14
Figura 3. Componentes para la preparación de caldo nutritivo.	17
Figura 4. Proceso de inoculación aséptico del microorganismo al caldo nutritivo	18
Figura 5. Caldo nutritivo con el pre inoculo en agitación a 150 rpm a temperatura ambiente	19
Figura 6. Medio de cultivo con diferentes concentraciones de cadmio, inoculado con <i>Pseudomonas putida</i> a los 7 días.	26
Figura 7. Viales con medio agar nutritivo N°1 a 445ppm y N° 2 a 144 ppm cadmio inoculados con <i>Pseudomonas putida</i>	27
Figura 8. <i>P. putida</i> vista del microscopio a 100x, luego de coloración Gram.	28
Figura 9. Datos de absorbancia de espectrometría de luz visible, del crecimiento microbiano de <i>P. putida</i> durante 30 horas. Lectura a 560 nm	29
Figura 10. Puntos de muestreo y muestra (1) Río santa negro km 74. (2) Rio negro kilómetro 76.	31
Figura 11. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomona putida</i> de tratamiento 25°C, Biomasa Ln(x) vs t(h).	33
Figura 12. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomona putida</i> 30°C, Biomasa Ln(x) vs t(h)	35
Figura 13. Curva de reducción de cadmio en los distintos tratamientos realizados. Grafica de concentración de cadmio vs horas	38
Figura 14. Grafica de Correlación de bioacumulación vs proteína a 25°C	40
Figura 15. Grafica de Correlación de bioacumulación vs proteína a 30°C	40
Figura 16. Proceso de Neutralización con Cal Hidratada.	41

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Datos de Absorbancia Cinética de crecimiento de Replicas I, II y III de 25 y 30°C.....	49
Anexo 2: Datos de biomasa y sustrato expresado en g/L de Replicas I, II y III de 25°C	50
Anexo 3: Datos de biomasa y sustrato expresado en g/L de Replica I, II y III de 30°C	50
Anexo 4: Datos de concentración proteica del tratamiento a 25°C.....	50
Anexo 5: Datos de concentración proteica del tratamiento a 30°C.....	51
Anexo 6: Preparación del Reactivo BRADFORD	51
Anexo 7: Preparación del Reactivo DNS	51
Anexo 8: Preparación de caldo Nutritivo.....	51
Anexo 9: Preparación de NaOH 20%.....	51
Anexo 10: Preparación de agar nutritivo	51
Anexo 11: Muestras para el análisis de absorción atómica y para lectura en espectrometría de luz visible en muestras de 30°C.....	52
Anexo 12: Simulación de Cinética de crecimiento vs consumo de sustrato en Software Mathematica, tratamiento 30°C.....	53
Anexo 13: Curva de calibrado DNS, absorbancia vs concentración g/L.....	53
Anexo 14: Datos de absorbancia para determinar curva de calibración para DNS	54
Anexo 15: Datos de absorbancia obtenidos de espectrofotómetro de luz visible, para curva de calibrado.....	54
Anexo 16: Curva de calibrado para método Bradford, absorbancia vs concentración mg/ml.....	54
Anexo 17: Reporte de análisis de Replica I, tratamiento a 25°C y 30°C.....	55
Anexo 18: Reporte de análisis de la réplica II, del tratamiento de 25 y 30°C	56
Anexo 19: Reporte de análisis de la réplica III, del tratamiento de 25°C y 30°C.....	57

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de las temperaturas de 25°C y 30°C en cultivo batch usando *Pseudomonas putida*, para la bioacumulación de cadmio en agua contaminada del río del valle de Chuquicara, producto de la minería ilegal.

La muestra de agua contaminada se obtuvo en el kilómetro 74 y 76 del río Santa, seguidamente fue enviada al laboratorio de Lasaci de la Universidad Nacional de Trujillo para analizar la concentración de cadmio por equipo de espectroscopia de absorción atómica. Dando como resultado una concentración de 3.8 ppm de cadmio en el agua del río Santa. Esta concentración inicial fue tratada para comprobar la bioacumulación de *P. putida*, cada tratamiento con temperatura 25°C y 30°C en un caldo de nutritivo.

La investigación se realizó en la Universidad Nacional del Santa en el laboratorio de Investigación de Biotecnología. En primera instancia, se realizó el aislamiento de la muestra de agua del río Santa de *P. putida* en medio agar nutritivo y caldo nutritivo suplementado con sales de cadmio como medio selectivo. Posteriormente, se evaluó las capacidades de resistencia y su actividad bioacumulativa, demostrando así que *P. putida* tiene una tolerancia al cadmio de hasta 140 ppm, y en un ensayo de bioacumulación vs absorción, se demostró que la bacteria tiene la capacidad de bioacumular cadmio en etapa de crecimiento y no como células muertas.

Los ensayos tanto para temperaturas de 30°C y 25°C tuvieron una duración de 10 días bajo las mismas condiciones de agitación a 150 rpm y 7 pH, determinándose una mayor capacidad de bioacumulación a temperatura de 30°C con una bioacumulación de cadmio de hasta un 89.18%, por otro lado, el tratamiento a 25°C tuvo una bioacumulación de cadmio de hasta 75.99%. Finalmente se concluye, la capacidad de bioacumular cadmio en *P. putida* a una temperatura optima a 30°C.

Palabras claves: Bioacumulación, Metalotioneínas, *P. putida*, cadmio

ABSTRACT

The objective of this research work was to evaluate the effect of temperatures of 25°C and 30°C in batch culture using *Pseudomonas putida*, for the bioaccumulation of cadmium in contaminated river water in the Chuquicara valley, a product of illegal mining.

The contaminated water sample was obtained at kilometers 74 and 76 of the Santa River, then it was sent to the Lasaci laboratory of the National University of Trujillo to analyze the cadmium concentration by atomic absorption spectroscopy equipment, resulting in a concentration of 3.8 ppm of cadmium in the water of the Santa River. This initial concentration was treated to check the bioaccumulation of *P. putida*, each treatment with temperature 25°C and 30°C in a nutrient broth.

The research was carried out at the National University of Santa in the Biotechnology Research laboratory. In the first instance, the isolation of the Santa River water sample of *P. putida* was carried out in nutrient agar medium and nutrient broth supplemented with cadmium salts as a selective medium. Subsequently, the resistance capabilities and its bioaccumulative activity were evaluated, thus demonstrating that *P. putida* has a tolerance to cadmium of up to 140 ppm, and in a bioaccumulation vs absorption test, it was demonstrated that the bacteria has the capacity to bioaccumulate cadmium in growth stage and not as dead cells.

The tests for both temperatures of 30°C and 25°C lasted 10 days under the same stirring conditions at 150 rpm and 7 pH, determining a greater bioaccumulation capacity at a temperature of 30°C with a cadmium bioaccumulation of up to 89.18%, on the other hand, the treatment at 25°C had a cadmium bioaccumulation of up to 75.99%. Finally, the capacity of cadmium to bioaccumulate in *P. putida* at an optimal temperature of 30°C is concluded.

Keywords: Bioaccumulation, Metallothioneins, *P. putida*, cadmium.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción y formulación del problema

El sector minero en el Perú representa un pilar en la economía y ha sido fuente de ingresos fiscales. El país ocupa el primer lugar en Latinoamérica en producción de zinc, plomo, estaño, plata y oro siendo segundo lugar solo en producción de cobre. A nivel mundial ocupa el primer lugar en plata, tercero en zinc, cobre y estaño, cuarto en plomo y quinto en oro.

La minería es una actividad extractiva que impacta no solo en la economía del país sino también en el medio ambiente. Y con ello ha traído consecuencia desfavorable para el medio ambiente y para el ser humano. La minería ilegal ha depredado la flora, destruido fuentes de agua y envenenado suelos y aire a causa de metales pesados que son utilizados sin control, lo que ha provocado un fuerte impacto en el medio ambiente y en la salud para la población.

En las últimas décadas han aumentado las concentraciones de metales no esenciales (Pb, Cd y Hg) en aguas y sedimentos rápidamente como consecuencia de actividades industriales. Los metales pesados son considerados los contaminantes más tóxicos en el ambiente por presentar efectos nocivos de toda la cadena trófica, en especial el cadmio, el cromo y mercurio son relevantes debido su persistencia y toxicidad (Beltrán, M. & Gómez, A., 2016). El cadmio y el plomo son los metales pesados que perjudican la salud humana, cuya producción mundial fue 3,840,000 toneladas y 19,400 toneladas en el 2008.

En la actualidad existe diversas técnicas fisicoquímico utilizadas para el tratamiento de estas sustancias, las cuales han mostrado algunas deficiencias y efectos secundarios a largo plazo. Por esta razón la implementación de otro tipo de tecnología que involucren seres vivos con capacidades metabólicas especiales ha emergido generando resultados prometedores en procesos de biotransformación.

Uno de los microorganismos usado en el área de la biorremediación es *P. putida* debido a su capacidad catabólica, requerimientos nutricionales no muy exigentes y fácil adaptación a condición adversas.

Golovlera et al. (1990) señalaron que las *Pseudomonas* son las bacterias más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos. *P. putida* se aíslan con mucha más frecuencia en suelos templados, agua, particularmente lugares contaminados con químicos orgánicos y con otro tipo de agente xenobiótico.

Ante lo expuesto, se plantea la siguiente interrogante: “¿Cuál será el efecto de la temperatura en un cultivo batch de *Pseudomona putida* para la bioacumulación de cadmio?”, el cual se dará respuesta al final de los tratamientos planteado en el siguiente capítulo de este proyecto de investigación.

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la temperatura de 25°C y 30°C de *Pseudomonas putida* en un cultivo batch para la bioacumulación de cadmio proveniente de los efluentes mineros vertidos en la cuenca del valle de Chuquicara

1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad de resistencia al cadmio en *Pseudomonas putida*.
- Evaluar la capacidad de bioacumulación de cadmio de *Pseudomonas putida* con células vivas y muertas.
- Evaluar la cinética de crecimiento de *Pseudomonas putida* vs la bioacumulación de cadmio.
- Determinar la concentración proteica celular de *Pseudomonas putida* en los ensayos.
- Evaluar la cinética de bioacumulación de Cd vs diferentes temperaturas de *Pseudomonas putida*
- Determinar el efecto de la temperatura de *Pseudomonas putida* en la bioacumulación de Cd.

1.3. Formulación de la hipótesis

Ante las variaciones de las temperaturas (25°C y 30°C), se obtendrá una mayor bioacumulación de cadmio en el tratamiento con temperatura de 30°C de *Pseudomonas putida* en un cultivo batch.

1.4. Justificación e Importancia

Los problemas ambientales que generan las mineras; son contaminación con tóxicos, en el agua (subterránea, ríos, lagos, acuíferos, glaciares), el aire y el suelo, alteraciones y destrucción de la flora y fauna del lugar, así como a las personas que están expuestas a las emisiones de toxinas y a metales pesados que alteran la salud y desarrollan graves enfermedades como intoxicaciones con metales, problemas respiratorios, cáncer entre otros. Tal es el caso del Valle de Chuquicara de la provincia del Santa departamento de Ancash situado en el Perú, a 3904 m.s.n.m. Chuquicara a lo largo de estos últimos años ha sido casa de ciertas mineras ilegales de cobre y oro, mineros artesanales, trayendo como problemática la contaminación del río, y a su vez generando grandes consecuencias en la cuenca del río Santa. Según la Autoridad Nacional del Agua (ANA), el máximo permisible de concentración de cadmio en ríos es de 0.05 ppm. En un análisis realizado en el año 2017, se determinó que al pueblo de Chuquicara llega el agua de río con una concentración de 3.8 ppm. Bajo estos datos resulta el por qué es importante realizar este proyecto de investigación, pues estas altas concentraciones de cadmio y otros metales puede perjudicar gravemente la salud de la población de Chuquicara y todo aquel que use las aguas subterráneas que fueron perjudicadas con estos efluentes tóxicos. Con el objetivo de promover una solución ante la contaminación del río para el pueblo y a su vez dar a conocer el campo de la biotecnología, se realizó la investigación con el título: “Efecto de la temperatura en la bioacumulación de cadmio, mediante un cultivo batch, utilizando *Pseudomonas putida* aislada de efluentes mineros vertidos en la cuenca del valle de chuquicara.”.

El proyecto de investigación mencionado se enfoca en utilización de *Pseudomonas putida* para el tratamiento de los efluentes líquidos mineros vertido en el río del pueblo de Chuquicara por las mineras, para mejorar la calidad de vida de la población de Chuquicara y reducir significativamente los problemas de contaminación, logrando esto con un método económico y

amigable con el medio ambiente, para ser considerado como una estrategia en la reducción de la contaminación del agua y como parte del desarrollo de tecnologías limpias para la protección del medio ambiente. Los datos obtenidos en el estudio permitirán establecer parámetros para ser tomados como referencias en futuras investigaciones en la utilización de efluentes mineros.

II. MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes

El impacto ambiental que ejerce la minería en nuestro país deteriora poco a poco nuestro entorno socio ambiental que sufre grandes daños en sus aguas, suelos y el ambiente que respiramos produciéndonos graves enfermedades con graves consecuencias. Este problema catalogado como mal social no es un problema reciente ni tampoco de las últimas décadas ya que viene de muchísimo tiempo atrás pero no con el nivel contaminante de hoy en día.

Según Nies D. & Silver S. (1999), “la contaminación ambiental con metales pesados constituye un creciente problema mundial. Estos elementos químicos representan una amenaza biológica, pues no son biodegradables” (p.12). Capó (2007) menciona que, “el cadmio es un metal pesado considerado como uno de los elementos más tóxicos, junto con el mercurio y el plomo. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza asociado a distintos minerales” (p.5).

Según la opinión de Astete y Pérez (2014), “debido a su toxicidad, el cadmio se encuentra sujeto a una de las legislaciones más severas en términos ambientales y de salud humana” (p.11).

Marreno J, et al. (2009) menciona que:

En la actualidad, el tratamiento de los residuos que contienen metales se realiza fundamental por métodos fisicoquímicos, que son complicados, de elevados costos, con una baja eficiencia y presentan desventajas no solo económicas, si no también, ambientales, al permitir la liberación de grandes volúmenes de desechos líquidos y sólidos que aun presentan elevados contenidos de metales pesados. Existen evidencias de procesos de saneamiento económicamente viables basados en la utilización de

microorganismos. Sin embargo, muchos aspectos de la interacción microorganismo - metal son aún desconocidos y su aplicación requiere de un conocimiento profundo de las vías genéticas que codifican la resistencia y la biotransformación desarrollada por los organismos que integran la comunidad microbiana autóctona de esos ecosistemas (p.67).

Por otro lado, Martín (2008) menciona que:

La biotecnología ha separado dos grandes áreas dentro del mismo objetivo: bioacumulación y biosorción. La primera es considerada como un proceso activo de eliminación de metales pesados mediante mecanismos metabólicos involucrando biomasa viva, mientras que la biosorción es entendido como un proceso pasivo con mecanismos netamente fisicoquímicos, por medio de biomasa muerta (p.2).

Silver y Phung mencionan (2005), “las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos” (p.203).

Sobre el mecanismo de bioacumulación Loyley (2000), menciona que:

Cuando los metales se unen a la superficie celular pueden bioacumularse. La bioacumulación es un mecanismo celular que involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con un gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema H⁺ ATPasa, Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, este es secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas (MT) o también puede ser compartimentado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos (p.175).

Sobre las metalotioneínas, Rajendran et al. mencionan (2003), “las metalotioneínas (MT's) fueron descubiertas hace 45 años y juegan un rol central en el metabolismo de metales pesados y en el manejo de varias formas de estrés microbiano. Las MT's son proteínas de bajo peso molecular (6-7 KDa) ricas en cisteína. Estas proteínas han sido aisladas en especies bacterianas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*”. (p.113).

Mientas, Wu G, et al (2010) mencionan que, “las metalotioneinas juegan un rol fundamental en la interacción de microorganismo – metal, cuando el metal se une a ellas se facilita su absorción y transformación” (p.174).

Según Ramteke (2000), “algunas bacterias del género *Pseudomonas sp.* han mostrado ser eficientes en la bioacumulación de metales pesados en efluentes industriales contaminados” (p.2). Este proceso ha ganado importancia en los últimos años debido a su buen rendimiento, bajo costo, especificidad, mínima generación de lodos y fácil reutilización.

Menciona Fleming (1998), “*Pseudomonas* es un bacilo gran negativo aeróbico que existe en el suelo, pero también en el agua salada. Este género consume todo tipo de sustratos orgánicos como los azúcares y aminoácidos, alcoholes, hidrocarburos, ácidos húmicos e inclusive algunos plaguicidas sintéticos” (p.1).

Lujan (2014) menciona que:

Pseudomonas putida posee un potencial de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos. Esta cepa es portadora del plásmido TOL: pWW0, que codifica una ruta de degradación de tolueno xilenos que es una de la mejor caracterizadas en el ámbito de la degradación en cuanto a los aspectos bioquímicos y genéticos. (p.104).

Según Iturbe Rosario (2010) define:

A medida que aumenta la temperatura, las reacciones químicas y enzimáticas aumentan en la célula. Para cada organismo existe una temperatura mínima, por debajo de la cual no hay crecimiento, una temperatura óptima en la que el crecimiento es más rápido y una máxima, arriba de la cual ya no hay crecimiento. El intervalo para el crecimiento óptimo de la mayoría de las bacterias esta entre 20°C y 35°C. El efecto que tiene la temperatura es fundamental en los microorganismos y sus procesos, teniendo una temperatura óptima en donde se da un mejor proceso.

Entre algunas investigaciones que sirvieron como base y referencia para la elaboración de este proyecto fueron:

La tesis titulada: REMOCIÓN DE PLOMO Y CADMIO PRESENTE EN EL AFLUENTE DEL RÍO PATIVILCA, BARRANCA-LIMA POR CÉLULAS INMOVILIZADAS DE *Pseudomonas putida* ATCC 49128, elaborada por Bach Takahashi, K (2018), menciona que:

El tratamiento consistió en preparar perlas conteniendo 2,0 g de biomasa de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 adaptadas y mezcladas con 60 ml de alginato de calcio, sometidas a 0, 6, 12, 18 y 24 horas en aguas del río Pativilca. Finalmente se obtuvo una remoción de $71,21 \pm 1,0369$ % en plomo y de $96,88 \pm 0,5103$ % en cadmio. Por lo tanto, las células de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 inmovilizadas y adaptadas logran biorremediar las aguas contaminadas con iones metálicos (p.1).

La tesis titulada: Capacidad degradadora de sustrato en *Pseudomonas aeruginosa* frente a metales pesados presentes en muestras de sedimentos del río Chibunga, elaborada por Paredes, K. et al. (2021), menciona que:

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* mostró una tolerancia hacia todos los metales pesados en concentraciones de 2mM. Sin embargo, a mayores concentraciones (5 y 10 mM), la bacteria únicamente toleró la presencia de metales como el Al, Zn y Cu. La bioaumentación con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en las cuatro muestras probadas, redujo la concentración de todos los metales pesados que fueron medidos, siendo el Al, Ti y Zn los que disminuyeron hasta un 60% la concentración inicial presente en los suelos muestreados (p.497).

Un estudio realizado determinó la acumulación de Cd por *Pseudomonas putida* se vio considerablemente influenciada por el valor de pH y de la temperatura del medio, el tiempo de contacto, los niveles de biomasa y la concentración de Cd. Por lo tanto, el 93% de Cd se absorbió en un medio que contenía 10 mg de Cd. Harikrishna y Narasimhulu, (2012) afirma que, “Otro estudio utilizó en su medio un pH óptimo y una temperatura de 30°C, en el cual eliminó 80mg/L^{-1} de Cd después de 8 días, que fue más la eliminación de Cd por *P. putida*”. Por otro lado, Shamin & Rehman, (2012) en cambio, en otros estudios realizaron medios

definidos a una temperatura de 30°C a un pH 7.3 el periodo de acumulación se realizó en 8 semanas acumulando pequeñas concentraciones de Cd” (Higham, Sadler & Scawen, 1985). Otro medio que se realizó es el MSM que se agregaron 1 a 5 mg de cadmio, en el cual las bacterias si llegaron a crecer en un periodo de 6 a 10 horas, estando a una temperatura de 25°C (Miller & Pette, 2009).

2.2. Marco Conceptual

➤ Minería en el Perú

El en Perú se emplea una antigua tradición minera, tradición que mantiene y cultiva gracias a la presencia de empresas líderes a nivel internacional. El territorio peruano existe un enorme potencial geológico, la presencia de la Cordillera de los Andes que es muy extenso, constituye nuestra principal fuente de recursos minerales.

A nivel mundial y latinoamericano el Perú se ubica entre los primeros productores de diversos metales, (oro, plata, cobre, plomo, zinc, hierro, estaño, molibdeno, telurio, entre otros), lo cual es reflejo no sólo de la abundancia de recursos y la capacidad de producción de la actividad minera peruana, sino de la estabilidad de las políticas económicas en nuestro país.

Los metales pesados tóxicos como cromo Cr, Hg y Cd en el ambiente generan serios problemas en la calidad del agua y en la salud humana. Estos iones generan interferencias en las funciones metabólicas y en procesos bioquímicos y fisiológicos como la respiración y en la degeneración en la mayoría de los organelos celulares, incluso puede producir muerte celular. Recientemente altas concentraciones de metales pesados tales como cadmio, cromo y mercurio en suelos han sido reportadas en varios países y se han asociado con defectos de nacimiento, cáncer, lesiones de piel, retraso que conlleva a discapacidad, daño en hígado o riñón y otras enfermedades (Rajendran et al., 2003)

➤ Calidad de Agua

La calidad del agua se describe como las características químicas, físicas y biológicas del agua dependiendo del uso que se le va a dar. Para determinarla, se miden y analizan estos elementos, por ejemplo: temperatura, contenido mineral disuelto en ella y la cantidad de bacterias que contiene. (Fuente: Aqueae Fundación)

El concepto de calidad del agua se relaciona con el uso del agua para consumo humano, haciéndose referencia que el agua es de calidad cuando puede ser usada sin causar daño al consumidor. Sin embargo, dependiendo de otros usos que se puedan requieran para el agua, también se puede definir la calidad del agua en función de dichos usos.

El agua de las aguas superficiales simplemente es la conformación del ecosistema acuático donde se desarrollan diversas comunidades vivas que dependen de las características fisicoquímicas de sus aguas y la alteración de estas puede verse notablemente. La alteración de estos elementos conlleva a una contaminación donde se produce malos olores, cambio de temperatura, transparencia del agua, pH, demanda de oxígeno biológico, aumento de los nutrientes como el fósforo y nitrógeno la variación de estos elementos repercute en la biota (López, Pujante, Ribarrocha & Tapia, 1995)

➤ **Metales pesados**

Un metal pesado se define como un elemento que tiene propiedades metálicas como ductibilidad, conductividad, densidad, estabilidad como catión y especificidad a ligando (Garbisu et al, 2003). Bajo la denominación de metales pesados se incluye a un conjunto de 65 elementos de la tabla periódica con un número atómico mayor a 20 y con una alta densidad relativa, mayor o igual a 5 g/cm³ en su forma elemental.

Los metales como Cd, Pb y Hg pueden ejercer su toxicidad al interactuar metabólicamente con elementos nutricionalmente esenciales como el calcio y el hierro, interfiriendo con funciones fisiológicas vitales. El plomo y el mercurio pueden causar estrés oxidativo debido a la generación de especies reactivas de oxígeno como el H₂O₂, la presencia de especies reactivas de oxígeno en el organismo puede provocar daños importantes en los ácidos nucleicos, los lípidos y las proteínas, provocando la muerte celular o una respuesta carcinogénica (Giovanella et al., 2020).

➤ **Cadmio**

El cadmio es un metal pesado representado con el símbolo Cd, con un peso atómico de 112, un número atómico de 48, la densidad de 8,624 g/cm³, presenta coloración blanca ligeramente azulada. Los principales minerales donde se encuentra en mayor proporción están en la greenokita (CdS), otavita (CdCO₃) y Monteponita (CdO). El metal se encuentra mucho más asociada en los yacimientos de zinc en la mineral esfalerita. Es común que forme parte de casi todos los componentes del zinc, y puede alcanzar a contener un 0,1 a 0,3 % de cadmio, incluso es encontrado en minerales de plomo y cobre en concentraciones mucho más bajas (Agency For Toxic Substances And Disease Registry [ATSDR], 2012; Londoño et al., 2016; Ramírez, 2002).

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

Al cadmio se le reconoce como uno de los metales pesados con mayor tendencia a acumularse en las plantas. El cadmio causa severos desequilibrios en los procesos de nutrición y transporte de agua en las plantas (Singh & Tewari, 2003).

Las sales de cadmio son consideradas muy significativas en aguas contaminadas, no solamente por su alta toxicidad, sino por su habilidad para incorporarse en los alimentos, las plantas acuáticas y organismos mediante procesos naturales como bioacumulación y biomagnificación (Borker et al., 2013). Así mismo el Departamento de Servicios de Salud Humana de Estados Unidos propone que el cadmio sea considerado un compuesto carcinogénico (Waalkes, 2003).

➤ **Género *Pseudomonas***

El género *Pseudomonas* son bacterias Gram negativas, forma ovalada, poseen pared y membrana celular. Son bacterias aeróbicas, en algunos casos usan el nitrato para su crecimiento anaeróbico.

Pertencen a la subclase gamma de las Proteobacterias. Las cepas del género *Pseudomonas* pueden crecer en un medio mínimo, químicamente definido con iones de amonio o nitrato como fuente de nitrógeno y un solo compuesto como única fuente de carbono y energía. La temperatura óptima para su crecimiento de la mayoría de las cepas es aproximadamente 28-30°C, algunas especies crecen a una velocidad sustancial en 4°C. Para otras, la máxima temperatura es de 45°C, por lo tanto, no pueden ser termófilas.

Pseudomonas están presentes en la mayoría de los ecosistemas de suelo y agua, estas son capaces de metabolizar una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, además son bien conocidas por su capacidad de tolerar y resistir moléculas tóxicas, incluidos antibióticos, metales pesados, detergentes y disolventes orgánicos (Chien et al., 2013). Además, poseen la habilidad para utilizar diversos sustratos, incluyendo aquellos creados por el petróleo.

Entre los géneros bacterianos que han sido reportados, se encuentran bacterias Gram positivas como: *Bacillus cereus*, *Arthrobacter* sp. y *Corynebacterium* sp. y Gram negativos: *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* spp. y *Ralstonia* sp. (Jaroslwiecka & Piotrowska 2014; Oves et al., 2017).

➤ ***Pseudomonas putida***

Pseudomonas putida es una bacteria aeróbica, forma de bacilo corto, Gram negativa muy importante en biotecnología. Esto se debe, en parte, a su gran versatilidad metabólica, que le permite crecer en ambientes muy diversos y utilizar muchos compuestos diferentes como fuente de carbono y energía. Sin embargo, la asimilación de muchos de ellos está sujeta a represión catabólica, es decir, la expresión de los genes implicados en el transporte y metabolismo de estos sustratos está reprimida cuando en el medio hay otro compuesto que permite a la bacteria un crecimiento más eficiente. Este proceso facilita una asimilación jerárquica y secuencial de las fuentes de carbono presentes en el medio, utilizándose primero aquellas más favorables. (Palomino & Gonzáles, 2014, p. 1).

Esta bacteria desempeña un papel importante en los procesos de eliminación debido a su delgada pared celular, ya que contiene una cantidad más pequeña de peptidoglicano. Sin embargo, la presencia de una capa exterior adicional compuesto por fosfolípidos y los lipopolisacáridos dan este tipo de bacterias una carga negativa, lo que facilita la unión de metales.

Como señala Hernández Sofia (2014), menciona que: “entre las bacterias del género *Pseudomonas* de importancia biotecnológica y medioambiental destaca *Pseudomonas putida*, un microorganismo no patógeno capaz de vivir en suelos, rizosfera y aguas dulces, que es un paradigma de versatilidad metabólica”(p. 1).

➤ **Bioacumulación**

Las interacciones a nivel intracelular entre bacterias y metales pesados, se dan inicio con un proceso activo conocido como bioacumulación, seguido de transformaciones enzimáticas, y/o inducciones de la síntesis de proteínas enlazadas. Aunque los niveles de cationes metálicos necesarios para el crecimiento bacteriano son bajos, los mecanismos de acumulación también funcionan a altas concentraciones, y esto puede incidir en la toxicidad del metal sobre el organismo que los acumula y la comunidad microbiana a la cual pertenece. No resulta sencillo comprender la acumulación de metales tóxicos en los microorganismos; sin embargo, parece que el almacenamiento intracelular de estos compuestos confiere resistencia a metales pesados en algunas bacterias (Kasan, 1993; Jackson et al., 2000) La mayoría de las especies metálicas que se acumulan en las células bacterianas pueden ser transformadas a compuestos de menor toxicidad por ciertos complejos enzimáticos. A nivel del microorganismo, hay un límite para la cantidad de metal que se puede acumular sin perder la viabilidad y, por lo general, antes de llegar a concentraciones letales se activan los mecanismos de resistencia y se induce la síntesis de enzimas transformadoras o de proteínas enlazadoras de los metales (Silver, 1994).

La bioacumulación es el proceso celular que involucra a un sistema de transporte de membrana que internaliza el metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía, este consumo energético se realiza a través de la H⁺-ATPasa; una vez incorporado el metal pesado al citoplasma este es secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneinas (MT),

fitoquelatinas (FQ) y algunos nuevos péptidos de unión a metales, si se trata de hongos este es compartimentalizado dentro de las vacuolas (Marrero et al, 2010).

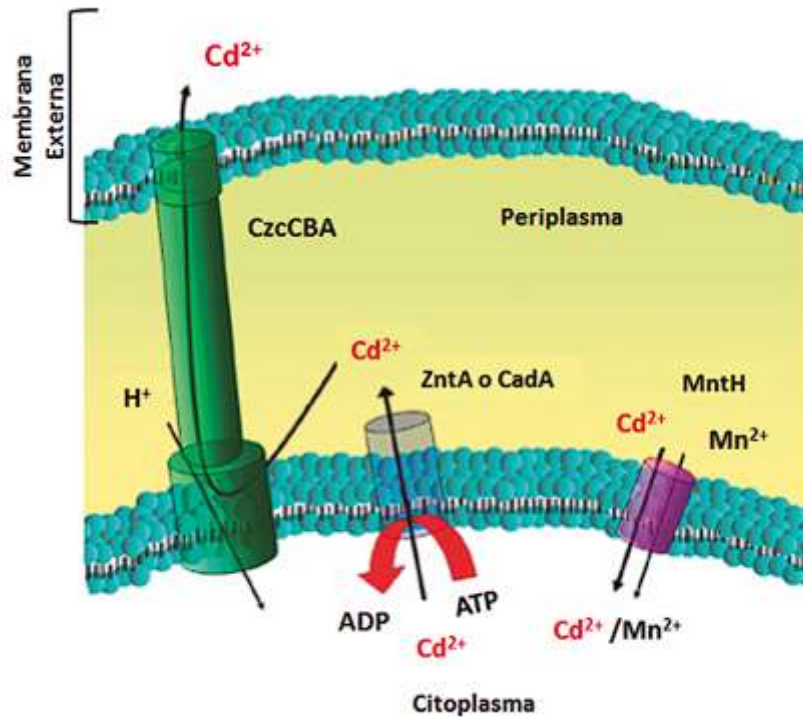


Figura 1: Resistencia al Cd²⁺ de bacterias. Entrada y salida de cadmio en una célula

Marreno & Coto. (2005) menciona que: “El cadmio atraviesa la membrana citoplasmática a través de una vía de transporte de manganeso (MntH), que depende del potencial de la membrana (ver estructura púrpura). El cadmio también puede ingresar a la célula a través del transportador de zinc ZntA o CadA (ver flecha roja). El sistema de eflujo de cadmio (CzcCBA) excreta cadmio a través de una proteína anti-puerto Cd²⁺ / 2H⁺ (ver estructura verde)” (p,23).

➤ Metalotioneínas

Las metalotioneínas (MT's) fueron descubiertas hace 45 años y juegan un rol central en el metabolismo de metales pesados y en el manejo de varias formas de estrés microbiano. Las MT's son proteínas de bajo peso molecular (6-7 KDa) ricas en cisteína que se dividen en tres clases de acuerdo al contenido de cisteína y a su estructura; la primera clase son las que tienen dominios Cis-Cis, las segundas las

que tienen dominios Cis-X-Cis y las terceras las que tienen dominios Cis-X-X-Cis en donde X corresponde a cualquier aminoácido. Estas proteínas han sido aisladas de especies bacterianas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida* y los géneros *Cyanobacterium sp.* y *Syneococcus sp.* (Rajendran et al, 2003). Las metalotioneínas juegan un rol fundamental en la interacción microorganismo-metal, cuando el metal se une a ellas se facilita su absorción y transformación, en la actualidad se han encontrado y manipulado genéticamente nuevos péptidos que se unen a metales, estos contienen residuos de histidina o cisteína y muestran afinidad, especificidad y selectividad por ciertos iones de metales (Wu et al, 2010).

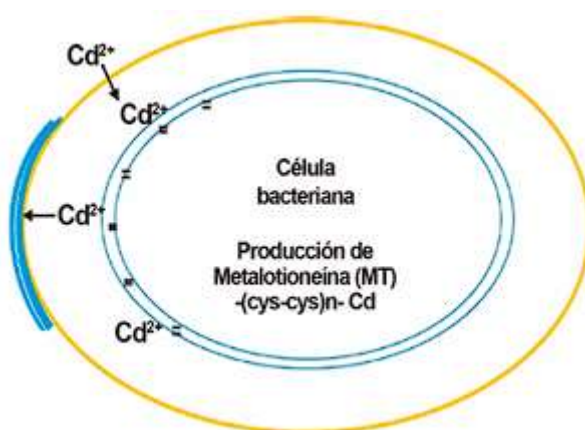


Figura 2: Ilustración del mecanismo de Bioacumulación.

“A el metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se realiza a través de la H⁺-ATPasa (Figura 2); una vez incorporado el metal pesado al citoplasma de la célula bacteriana, el cadmio es secuestrado por Metaloil-proteínas o Metalotioneína (MT) del grupo tiol o sulfhidrilos (-SH) (Son péptidos que se unen y forman complejos estables con el Cd²⁺), neutralizando de esta forma la toxicidad del metal pesado”(Mejia,2006).

➤ **Regulación de la expresión de los genes codificantes de MTs**

La mayoría de los genes MTs presentan cierto nivel de expresión en condiciones basales, en mayor o menor medida en función de cada organismo e isoforma génica. La expresión de los genes MTs se induce por una gran variedad de estímulos, tales como: metales pesados, agentes oxidantes y citotóxicos, hormonas, agentes inflamatorios y citoquinas, factores de crecimiento,

antibióticos, radiaciones y otros factores que son interpretados por la célula como señales de estrés (Haq et al., 2003).

La regulación de la expresión de las MTs ocurre principalmente a nivel transcripcional mediante la presencia de elementos de respuesta o elementos cis en la región promotora, a los que se pueden unir distintos factores de transcripción. Además de las clásicas cajas TATA y las regiones de iniciación de la transcripción, los promotores de las MTs presentan, entre otros motivos inductores de la expresión, los siguientes elementos: los elementos de respuesta a metal (MREs), los elementos de respuesta antioxidante (AREs) y los elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) (Günther et al., 2012)

Los MREs (elementos de respuesta a metal) se encuentran en multicopia y presentan la siguiente secuencia consenso: TGC(G/A) CNC, siendo N cualquier nucleótido (Stuart et al., 1985). Además, los MREs parecen estar implicados tanto en la expresión basal como en la activación de la transcripción de los genes MTs en respuesta a metales pesados y agentes causantes de estrés oxidativo (Haq et al., 2003).

El gen MTF-1 se expresa de manera constitutiva y, ante una situación de estrés, la proteína se traslada del citoplasma al núcleo, activándose y uniéndose a los motivos MREs de los promotores de los genes MTs, regulando su transcripción mediante interacciones directas o indirectas con distintos componentes de la maquinaria transcripcional de la ARN polimerasa II.

➤ **Impacto del cadmio en la salud**

La industria que realizan actividades y producción del cadmio tales como fabricación de baterías níquel-cadmio, quema de combustibles fósiles, generación de polvos por el proceso de fabricación de cementos y fertilizantes fosfatados son fuentes de emisiones de cd a la atmósfera y además de contaminación en los recursos hídricos. Los ríos contaminados forman parte de la irrigación (agua empleada para la agricultura) de los cultivos además este metal es capaz de formar compuestos al combinarse otros elementos, y unirse fuertemente a las partículas del suelo; las concentraciones del suelo también están ligadas al uso de fertilizantes químicos y la deposición atmosférica. El cadmio está presente en el medio ambiente por erupciones volcánicas, incendios forestales y entre otros fenómenos naturales. La concentración en el suelo está ligada a los distintos

factores, principalmente por la adición de fertilizantes a base de fosfatos. Debido a la similitud del metal con el zinc, provoca que la planta absorba el cadmio en vez del zinc. La concentración de la biodisponibilidad del cadmio aumenta en el suelo cuando el pH del suelo disminuye (Martínez, Souza, Bucio, Gómez & Gutiérrez, 2013).

La adsorción gastrointestinal del cd ingerido en condiciones normales es de 2 a 6 % aproximadamente. Las personas que presentan una reducción de concentración de ferritina, debido a que poseen escasas reservas de hierro en su organismo, presentan una absorción de cd de hasta 20 %. La exposición de este metal por vía respiratoria puede absorber concentraciones significativas, a consecuencia de inhalar el humo de tabaco y al polvo de cadmio por exposición laboral. Se calcula que la absorción pulmonar de polvo de cd inhalado es del 20 % al 50 %. El metal se traslada por el torrente sanguíneo, ligado con las células hemáticas y albúmina, hasta llegar al hígado. Desde ahí inicia la producción de la proteína metalotioneína con bajo peso molecular que se une al cadmio; el 80 % al 90 % se considera que se une con el metal, evitando la aparición del efecto tóxico de los iones de cadmio libres. Por último, es expulsado por la orina al filtrarse a través de los glomérulos. El proceso de la eliminación es muy lento, y por esa razón se acumula en el organismo, se calcula que este proceso puede durar entre los 7 y 30 años (OIT, 1998; Pérez & Azcona, 2012).

Los principales órganos que afecta el cadmio son los riñones, huesos y los pulmones. El hígado y riñones son donde el metal se almacena, uno de los primeros indicios más comunes, debido a la exposición por mucho tiempo, es el daño que sufre la función renal y también de tubulointersticial. Los efectos que se producen por inhalación no son muy bien definidos desde el comienzo, pero después se distingue manifestándose por fiebre, alteraciones digestivas, dolor torácico, disnea edema agudo de pulmón, lo cual lograría causar fallecimiento por la insuficiencia respiratoria. Además, puede ocasionar anemia, albuminuria, hepatitis y anuria, ocasionando hepatonecrosis llevando a la persona a la muerte. El caso por ingestión los síntomas se manifiestan con náuseas, vómito, dolores abdominales y cefalea, también es muy frecuente la diarrea intensa más colapso. Se estima que los síntomas surgen al ingerir los alimentos o bebidas con cadmio mayor a 15 ppm (Pérez & Azcona, 2012). Los efectos crónicos en trabajadores por la exposición del cadmio, conlleva a un síndrome con enfermedad de los

túbulos renales y enfisema pulmonar; además de otros efectos, como anemia, cambios en el metabolismo de los minerales y alteraciones hepáticas. Al cadmio se ha asociado el aumento de incidencias de cáncer de pulmón y prostático, por consecuencia a la inhalación de cadmio por exposición laboral (Pérez & Azcona, 2012).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Medios de cultivo

Para el mantenimiento y replicación de *Pseudomonas putida*, para los ensayos, pruebas y tratamientos, se usó medio de cultivo Agar y caldo nutritivo.

Para la preparación del Agar nutritivo se empleó pluripeptona 5 g/L, Extracto de carne 3 g/L, Cloruro de sodio 8 g/L, Agar 15 g/L. Se ajustó a un pH de 7, posteriormente se llevó a ebullición hasta el primer hervor, y finalmente fue llevado a autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para la preparación del Caldo nutritivo se empleó pluripeptona 5 g/L y Extracto de carne 3 g/L, posteriormente se llevó a autoclave durante 15 min a 121°C.



Figura 3. Componentes para la preparación de caldo nutritivo

3.2. Prueba de resistencia al cadmio usando Cloruro de Cadmio (CdCl₂)

Para la prueba de resistencia de cadmio se empleó dos matraces Erlenmeyer con 200 ml de caldo nutritivo cada uno, suplementado con concentraciones de CdCl₂: 0.05 g y 0.15 g en cada matraz. En la cámara de Flujo Laminar, se añadió 1 ml del inóculo a cada matraz, se colocó los matraces a temperatura ambiente en agitación a 100 rpm durante 7 días.

Pasado los 7 días, se realizó un aislamiento bacteriano de cada matraz en viales con medio agar nutritivo inclinado se preparó 30 ml de agar nutritivo. Los viales fueron llevados a estufa a 30°C durante 48 hrs.



Figura 4. Proceso de inoculación aséptico del microorganismo al caldo nutritivo

3.3. Prueba de bioacumulación (células vivas) vs bioadsorción (células muertas) con *Pseudomonas putida*.

3.3.1. Bioacumulación (células vivas)

La prueba de bioacumulación, se preparó 300 ml de caldo cultivo suplementado con 3.80 ppm de CdCl₂, a continuación, se tomó una muestra de 100 ml e inoculó 1 ml de biomasa microbiana. Se colocó el matraz en agitación a 100 rpm a temperatura ambiente. Luego de 5 días, se tomó una muestra final de 100 ml. La muestra inicial y final fueron analizadas en espectrofotometría de adsorción atómica en el laboratorio de LASACI – Trujillo, cabe resaltar que son 100ml de muestra para el análisis.

3.3.2. Bioadsorción (Células muertas)

La prueba de bioadsorción se utilizó 300 ml de caldo nutritivo, se inoculó 1 ml de biomasa microbiana inactiva, luego se llevó a agitación 100 rpm a temperatura ambiente durante dos días.

Se realizó peso seco para determinar g/L del cultivo.

Después de los dos días de incubación se tomó 1 ml del caldo y se colocó en centrifuga a 5000 rpm durante 5 min. Luego se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de agua destilada y se volvió a centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos. Nuevamente se desecha el sobrenadante y se agregó 1 ml de agua destilada. Se llevó a un vórtex a 1500 rpm durante 30 segundo. El pellet diluido en agua destilada se vierte en un capachito, luego se llevó a estufa a 80°C durante 12 horas. Posteriormente, se pesó en la balanza digital con ayuda de la campana desecadora y una pinza.

Se preparó 300 ml de caldo nutritivo suplementado con CdCl₂ a una concentración de 3.80 ppm de Cd, se tomó una muestra de 100 ml y se vierte las células secas dentro de una cámara de flujo laminar, de manera estéril. Finalmente, se llevó a shaker a 100 rpm durante 5 días, y se toma una muestra final de 100 ml, proceder hacer la lectura en espectrofotómetro de adsorción atómica. Cabe mencionar que el laboratorio de LASACI, pide 100 ml de muestra para el espectrofotómetro de absorción atómica.



Figura 5. Caldo nutritivo con el pre inóculo en agitación a 150 rpm a temperatura ambiente.

3.4.Toma de muestra del río

Para la recolección de muestra de agua del río, se consideró los siguientes criterios para la ubicación de los puntos de control en cuerpos loticos (ríos o similares) en el capítulo 5.1.1. de la guía de Protocolo Nacional para el monitoreo de la calidad de recursos hídricos superficiales.

Los puntos de control en el cuerpo receptor lótico se ubican fuera de la zona de mezcla: un punto aguas arriba a una distancia de 50 metros del vertimiento y un punto de aguas abajo a una distancia de 200 metros en la misma orilla donde se realiza el vertimiento. La distancia de 50 metros del punto de control de aguas arriba del vertimiento corresponde a una distancia referencial; la ubicación exacta dependió de las condiciones naturales del cauce del río o quebrada.

Las muestras se tomaron lo más lejos de la orilla, sujetando el frasco por el fondo en posición invertida, sumergiéndolo completamente y en sentido contrario a la corriente, sin remover el fondo del río, una vez que se tuvo el volumen adecuado aproximadamente 200 ml. Las muestras fueron rotuladas y trasladadas a la Universidad Nacional de Trujillo, donde fueron analizados en el laboratorio LASACI por el equipo de espectrofotometría de absorción atómica.

3.5. La muestra

De la misma forma para los ensayos a realizar durante el proyecto, se recolectó 5 litros de muestra, 2.5 litros a 50 metros del punto de control de aguas arriba y 2.5 litros a una distancia de 200 metros en la misma orilla donde se realiza el vertimiento. La muestra, previamente fue homogenizada y se llevó a analizar a laboratorio LASACI, en la Universidad Nacional de Trujillo. Para determinar la concentración inicial total de cadmio previo a los ensayos.

3.6. Tratamiento de bioacumulación a 25°C

Para el tratamiento de bioacumulación a 25°C, se inoculó 1 ml *P. putida* en 30 ml de caldo nutritivo. Este pre-inóculo, se llevó a agitación 150 rpm a temperatura ambiente durante 24 horas

Después del tiempo establecido, el pre-inóculo fue aforado a 300 ml con el mismo medio de cultivo, este nuevo inóculo se llevó a agitación 150 rpm a temperatura ambiente durante 24 horas. (10% del volumen total) (Becerra C., 2007).

Pasado este periodo, el inóculo fue vertido en un matraz que contenía 700 ml de agua de río contaminado a un pH de 7. Esta fermentación, se mantuvo a una temperatura de 25°C y fue puesto en agitación constante a 150 rpm durante 10 días.

Se tomó muestras de 5ml para datos cinéticos cada 12 horas durante el tiempo que duro el proceso.

Se hizo un muestro cada 36 horas y se tomó en cada tiempo 100 ml de muestra. La muestra se llevó a centrifugar a 5000 rpm por 15 min. El sobrenadante obtenido se filtró dos veces con papel filtro simple y se llevó a leer en el espectrofotómetro de absorción atómica en la Universidad Nacional de Trujillo. Para determinar la reducción de cadmio. Este tratamiento de 25°C se realizó 3 réplicas.

3.7. Tratamiento de bioacumulación a 30°C

Para el tratamiento de bioacumulación a 30°C, se inoculó 1 ml *P. putida* en 30 ml de caldo nutritivo. Este pre-inóculo, se llevó a agitación 150 rpm a temperatura ambiente durante 24 horas.

Después del tiempo establecido, el pre-inóculo fue aforado a 300 ml con el mismo medio de cultivo, este nuevo inóculo estuvo en agitación 150 rpm a temperatura ambiente durante 24 horas. (10% del volumen total) (Becerra C., 2007).

Pasado este periodo, el inóculo fue vertido en un matraz que contenía 700 ml de agua de río negro a un pH de 7. Esta fermentación, se mantuvo a una temperatura de 30°C y fue puesto en agitación constante a 150 rpm durante 10 días.

Se tomaron muestras de 5ml para datos cinéticos cada 12 horas durante los 10 días.

Se hizo un muestreo cada 36 horas y se tomó en cada tiempo 100 ml del caldo nutritivo. La muestra se llevó a centrifugar a 5000 rpm por 15 min, el sobrenadante obtenido se filtró dos veces con papel filtro simple y se llevó a leer en el espectrofotómetro de absorción atómica en la Universidad Nacional de Trujillo. Para determinar la reducción de cadmio. Este tratamiento de 30°C se realizó 3 réplicas.

3.8. Método de peso seco

La cantidad total de biomasa presente en una muestra puede medirse en termino de peso seco por unidad de volumen, ya sea como sólidos en suspensión totales (SST) o sólidos en suspensión volátiles (SSV). Las células se separan del líquido bien por centrifugación bien por filtración (Arnáiz C., Isac L. & Lebrato J., 2000).

Se tomó una muestra de 2.5 ml de cada tratamiento (25°C y 30°C) cada 24 horas, durante 10 días. Obteniendo 10 muestras por cada tratamiento y cada réplica. Cada muestra fue realizado shock térmico (3 min caliente y 3 min frío) a 85°C y 0°C,

respectivamente, posteriormente las muestras fueron guardadas en refrigeración, previamente rotulados.

Posteriormente se prepararon 10 capachitos con papel aluminio y se secaron en el horno a 105°C durante 4 horas, para cada muestra. Se procedió a transportar los capachos secos en la campana desecadora hacia la balanza digital para pesarlas con ayuda de una pinza estéril.

Las muestras tomadas fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min. Desechando el sobrenadante y quedando con el pellet. Posteriormente se agregó 1 ml de agua destilada y se centrifugo a 5000 rpm durante 5 minutos. Se desechó nuevamente el agua o sobrenadante. Se vertió 1 ml de agua destilada al pellet nuevamente y se llevó a vórtex 1500 rpm durante 30 segundos.

Finalmente se agregó el contenido a cada capacho respectivamente y se llevó al horno durante 12 horas a 105°C, y se pesó cada capacho con ayuda de la campana desecadora y una pinza para no alterar el % bajo de humedad. Se tomaron datos de los pesos.

3.9. Curva de calibrado para DNS

Con el objetivo de tener una curva de calibración para determinar la concentración de glucosa se procedió a preparar una solución madre de la solución de dextrosa al 10%. La concentración total del medio químicamente definido es de 12g/L de dextrosa, al ser una concentración alta se procedió diluir hasta una concentración de 2g/L. Tomando como solución madre 0.1ml de dextrosa al 10% en 49 ml de H₂O destilada.

Para la curva de calibración se prepararon diluciones a partir de la solución madre: 0/0.5ml, 0.1/0.5ml, 0.2/0.5ml, 0.3/0.5ml, 0.4/0.5ml y 0.5/0.5ml. con agua destilada. En cada tubo de ensayo se añadió 0.5 ml de reactivo DNS a cada dilución. Los tubos se llevaron a shock térmico a 85 °C y 0 °C (3 min. Caliente y 3 min. Frio).

Posteriormente, se agregó 5ml de agua destilada en cada tubo de ensayo. Cada dilución se llevó a un vórtex a 1500 rpm durante 30 segundos. Se dejó reposar 10 minutos. Finalmente, se procedió a leer en espectrofotómetro de luz visible a 540 nm.

3.10. Determinación de azúcares reductores

Para determinar el consumo de sustrato en *Pseudomonas putida* se procedió a realizar un muestreo de cada 12 horas de cada tratamiento, durante 10 días.

Se tomó muestras de 5 ml cada 12 horas, inmediatamente se aplicó shock térmico. Debido a la alta concentración inicial de dextrosa, se procedió a hacer diluciones 1/6 ml. Quedando como factor multiplicativo 6.

Posteriormente se procedió a tomar 0.5 ml de las diluciones y se agregó 0.5 ml. de reactivo DNS y se realizó shock térmico a 85°C y 0°C. Se agregó 5 ml de agua destilada y se agito en un vórtex durante 30 segundos a 1500 rpm.

Finalmente se hizo lectura en espectrofotómetro a 540 nm.

3.11. Curva de calibrado para concentración proteica (Bradford)

Para la curva de calibrado se utilizó el reactivo BSA (Albumina Sérica Bovina)

Se colorean las muestras con el método colorimétrico de Bradford, con Azul de Coomassie. El color de las muestras es azul, pero de distintos tonos, ya que el color varía según la concentración de las proteínas, a medida que ésta sea mayor, el tono de azul aumenta. La muestra es homogenizada con la máquina de Vortex y luego se lleva al espectrofotómetro. En dicho instrumento se miden las absorbancias de las muestras a 595nm

La concentración de la muestra incógnita de BSA, se determina obteniendo el valor de la absorbancia en el espectrofotómetro y dicho valor, es extrapolado en el gráfico de la curva de calibrado. De esta manera se obtiene la concentración de la muestra.

La solución madre será el reactivo BSA a 10 ug/ml, posteriormente se harán diluciones de 0/500 uL, 25/500 uL, 50/500uL, 125/500 uL, 250/500 uL, 375/500 uL, 500/500.

3.12. Determinación de concentración proteica (Bradford)

3.12.1. Ruptura celular (Choque Osmótico)

“Para la determinación de proteínas fue necesario usar una concentración celular. La extracción de las proteínas celular se realizó mediante hidrolisis básica con NaOH al 20% y se cuantificaron las proteínas solubles” (Bradford M., 1976).

Para realizar la ruptura celular, se tomó 5 ml de muestra de cada tratamiento cada 24 horas. Luego, se realizó el procedimiento de shock térmico 3 minutos en caliente a 85°C 3 minutos en frío a 0°C.

Cada muestra fue centrifugó a 5 000 rpm durante 5 minutos, se procedió a desechar el sobrenadante. Se agregó 1 ml de agua destilada al pellet, se volvió a centrifugar durante 5 minutos a 5 000 rpm. Nuevamente, se desecha el sobrenadante y se agrega 1ml de NaOH al 20%. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min.

3.12.2. Método de Bradford

Para este método, se debe tomó en cuenta que luego de la ruptura celular, se procedió a tomar 100 ul de cada muestra. Se agregó el reactivo de Bradford a cada muestra. Finalmente, se llevó a vórtex a 1500 rpm durante 30 segundos.

Cada muestra fue llevado al espectrofotómetro a 595 nm.

3.13. Método de modelamiento matemático con Monod

Modelo matemático para la determinación de parámetros de la cinética de crecimiento microbiano.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

Dónde:

μ es la tasa de crecimiento específico de los microorganismos

μ_{max} es la tasa máxima de crecimiento específico de los microorganismos, h⁻¹

S es la concentración del sustrato limitante, g/L

K_s es la "constante de media velocidad" -el valor de S cuando $\mu / \mu_{max} = 0,5$

μ_{max} y K_s son coeficientes empíricos a la ecuación de Monod. Ellos serán diferentes entre las especies y sobre la base de las condiciones ambientales.

3.14. Método para neutralizar el Cadmio

Los factores que influyen en la neutralización son: naturaleza de las partículas en el agua residual, pH, temperatura y balance iónico. La cal hidratada o hidróxido de calcio es una sustancia usada comúnmente como coagulantes ayudan a la precipitación de metales elevando su pH, obteniendo hasta un 90% de remoción.

El uso de cal hidratada es comúnmente usado en la industria minera para neutralizar agentes químicos tóxicos, cambiando el estado físico de los sólidos disueltos. Además de ser un compuesto económico y de fácil encontrar en el mercado.

Por lo tanto; la suspensión microbiana obtenida de cada réplica se llevó a centrifugar a 5000 rpm por 3 min, se desechó el sobrenadante y se utilizó el pellet, posteriormente se agregó 2ml de agua destilada y se volvió a centrifugar, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de agua destilada y se llevó a vortex a 1500 rpm durante 30 segundos. se obtuvo 50 ml de biomasa de las tres réplicas y los tres tratamientos, luego se llevó a neutralizar con cal hidratada.

La biomasa contenida con cadmio se agregó en un frasco de 500 ml aproximadamente, se utilizó un pH-metro, en cual arrojó como resultado un pH 6.1 (pH neutro) del sobrenadante, luego se agregó 50 gr de cal hidratada y nuevamente se midió su pH en cual obtuvo un pH 11, a continuación, se agitó durante 5 minutos para que la cal tenga contacto con todo el medio y posteriormente se deja reposar por 5 días aproximadamente, hasta que se precipite los sólidos disueltos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Prueba de Resistencia al Cadmio

La prueba de resistencia al cadmio en *P. putida* se hicieron en soluciones suplementadas con concentraciones 144ppm y 445 ppm de cloruro de cadmio con la finalidad de obtener cepas resistentes al cadmio.

El mecanismo de resistencia de los microorganismos involucra el flujo de salida de iones de metales pesados hacia el exterior de la célula, la acumulación y la complejación de los iones metálicos dentro de la célula; también la disminución de la toxicidad mediante la reducción de los iones de metales pesados. La toxicidad del metal está relacionado a la biodisponibilidad, es cuya capacidad para transferir un elemento ambiental a los organismos vivos; dependerá de la concentración total del metal, los factores fisicoquímicos y factores biológicos tales como la biosorción, bioacumulación y solubilización (Beltran & Gómez, 2015).

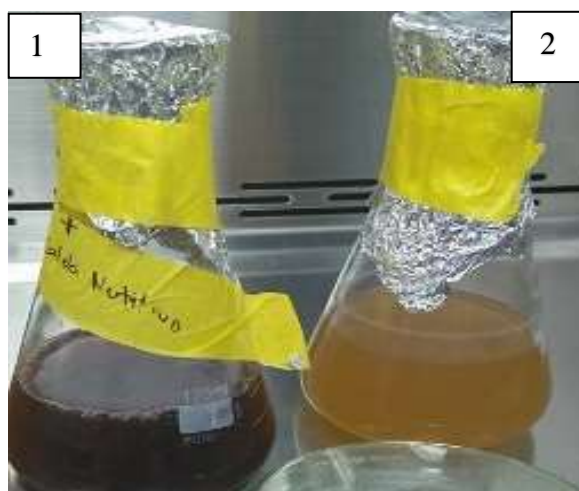


Figura 6. Medio de cultivo con diferentes concentraciones de cadmio, inoculado con *Pseudomonas putida* a los 7 días.

Se observa en la figura 6, el cambio de color se mostró en el matraz N°1 que contenía una concentración 445 ppm de cadmio a diferencia del matraz N°2 con concentración 144 ppm que no presentó cambio en el color del medio de cultivo. Posteriormente, se hizo un aislamiento bacteriano en viales inclinado que contenían medio agar nutritivo.



Figura 7. Viales con medio agar nutritivo N°1 a 445ppm y N° 2 a 144 ppm cadmio inoculados con *Pseudomonas putida*.

Se realizó un aislamiento de la bacteria del matraz 1 y 2 de las concentraciones 445 ppm y 144 ppm cadmio. Cada matraz fue sembrado en un vial, con tres repeticiones cada uno.

Después de 24 horas, como se observa en la figura 7; los viales N° 1 no presentaron cambio de color en el medio de cultivo. Los viales N° 2, presentaron una variación en el color del medio, un color azul verdoso. Este color es característico de *Pseudomonas* sobre el medio.

Se conocen algunas cepas de *Pseudomonas* capaces de producir pigmentos con cualidades antibacterianas sobre otras bacterias, algunos de estos pigmentos son la pioverdina (amarillo verdoso), la piocianina (azul verdoso), la fluoresceína (amarillo) y la piorrubina (rojo-pardo) (Moore y col., 2006)

Naik & Dubei (2011), mencionan que:

“se ha informado que, bajo condiciones de estrés por la presencia de altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, se puede inducir la producción de pigmentos al medio en respuesta a estos elementos tóxico. Esto se debe a que los sideróforos presentes en los pigmentos pueden formar complejos estables con los metales como el Cd^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} y Cu^{+2} , lo cual influye en la movilidad del metal en el medio y por lo tanto se considera una estrategia importante de la célula para secuestrar el metal tóxico y sobrevivir sin que su presencia afecte su crecimiento” (p. 410).

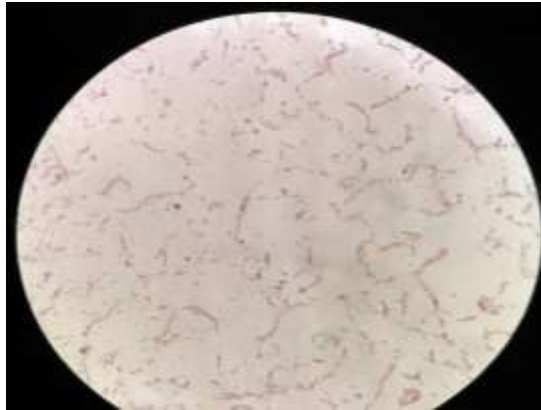


Figura 8. *P. putida* vista del microscopio a 100x, luego de coloración Gram.

Al realizar la tinción Gram de las colonias de los viales N° 2 (ver figura 7) como se observa en la figura 6, la muestra teñida se visualiza de color rosado evidenciando ser una bacteria gramnegativa y en forma de bacilos a una vista 100x en microscopio óptico.

“El género *Pseudomonas* constituye uno de los mayores grupos de bacterias aeróbicas estrictas, quimioheterótrofas, gram-negativas. Sus células son bastones rectos o curvos que no sobrepasan 0.8 μm de ancho y que se mueven mediante uno o varios flagelos polares” (Stanier et al., 1981).

4.1.1. Prueba de bioacumulación vs adsorción

4.1.1.1. Bioacumulación (Células vivas)

Datos obtenidos de un batch de 30 horas de fermentación.

Tabla 1: Cinética de crecimiento microbiano de *P. putida* durante las primeras 30 h

Tiempo (h)	Absorbancia	Tiempo (h)	Absorbancia
0	0.108	16	0.281
2	0.118	18	0.309
4	0.124	20	0.402
6	0.144	22	0.531
8	0.163	24	0.665
10	0.187	26	0.776
12	0.201	28	0.832
14	0.245	30	0.976

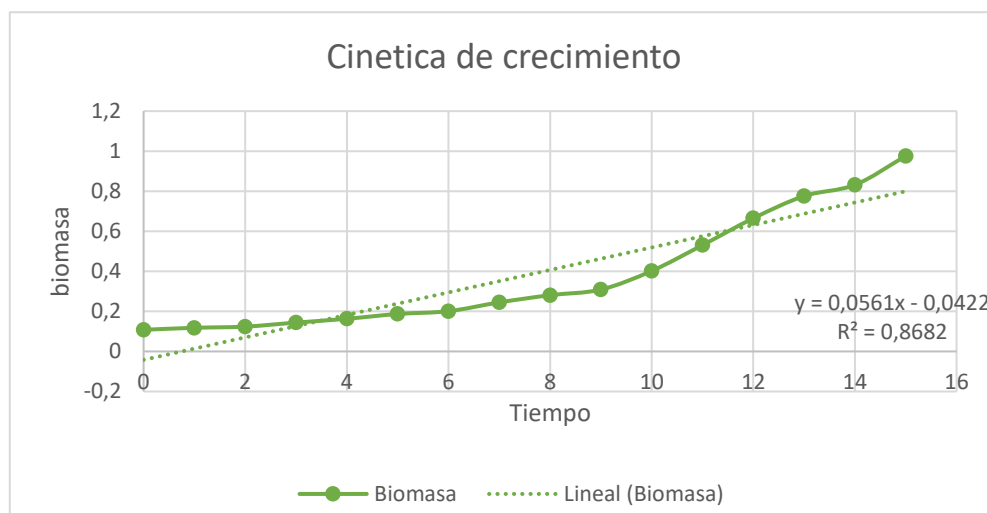


Figura 9. Datos de absorbancia de espectrometría de luz visible, del crecimiento microbiano de *P. putida* durante 30 horas. Lectura a 560 nm

4.1.1.2. Adsorción

Tabla 2: Datos de biomasa seca para la prueba de adsorción.

N° capacho	Peso de capacho	biomasa + capacho	biomasa seca
1	0.0919	0.098	0.0061
2	0.1019	0.1083	0.0064
3	0.0822	0.0891	0.0069
4	0.0855	0.0927	0.0072
5	0.0964	0.1042	0.0078
6	0.0876	0.0961	0.0085
7	0.0871	0.0956	0.0085
8	0.0997	0.1088	0.0091
9	0.0891	0.0999	0.0108
10	0.087	0.098	0.011
11	0.0947	0.1058	0.0111
12	0.0883	0.0995	0.0112
13	0.0908	0.1024	0.0116
14	0.0731	0.0819	0.0148
15	0.0912	0.1071	0.0159

La biomasa seca total añadida es de : 0.1384 g

Tabla 3: Datos de concentración de cadmio del tratamiento de Bioacumulación vs Adsorción

Células Vivas (MV)	mg Cd/L	Células Secas (MS)	mg Cd/L
Muestra Inicial	3.81 ppm	Muestra Inicial	3.80 ppm
Muestra Final	1.76 ppm	Muestra Final	3.77 ppm

Después de pasar 5 días, la muestra inicial que fue de 3.80 ppm llegó a disminuir a 3,77 ppm, no se considera una disminución significativa.

Como se puede apreciar en el ensayo de bioacumulación con células vivas en caldo nutritivo con cloruro de cadmio, se logró una disminución de cadmio de 2.05 ppm en 5 días de tratamiento a temperatura ambiente. En términos de eficiencia en el ensayo de bioacumulación de cadmio con células vivas, se logró una eficiencia de bioacumulación de 53,6% en un tratamiento de 5 días a una temperatura ambiente. Un punto que debemos tomar en cuenta es que el cadmio siempre está asociado a metales como el zinc o plomo y raras veces cobre. Es una posibilidad que *Pseudomonas putida* también bioacumuló un porcentaje de estos otros metales. Bajo esta premisa, podría dar paso a otro tipo de investigaciones con el microorganismo en mención. No obstante, no se puede descartar la probabilidad que a los aislados ante la presencia del metal se les haya inducido la producción de proteínas de unión a metales, conocidas como metalotioneínas, las cuales permiten que se dé la bioacumulación de metales tóxicos dentro de la bacteria (Bedoya et al, 2019)

4.1.2. Toma de muestra para tratamientos.

Recolección de muestra de agua en el Río Santa km 76.

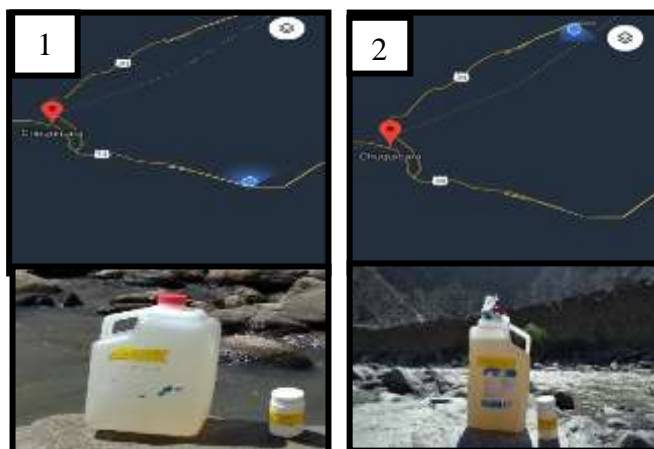


Figura 10. Puntos de muestreo y muestra (1) Río Santa km 74. (2) Río Negro kilómetro 76

Se analizaron los parámetros de las muestras puntuales, por medio de temperatura, pH en la cual representará la composición del agua, el tiempo y las circunstancias que fue encontrado. (Tabla 4)

Tabla 4: Información relevante del muestreo de agua del río en los puntos N° 1 y 2

	Punto N°1	Punto N°2
Tiempo de extracción de muestra	11:00 am	2:00 pm
Temperatura del agua	10- 13 °C	10- 13 °C
Temperatura ambiente	16° C	15°C
Distancia (Panamericana norte)	kilómetro 74	kilómetro 76
Lugar	Río Negro	Río negro
Profundidad	5 cm de la superficie del rio	5 cm de la superficie del rio
pH	7	7
Cantidad	3000 ml 100 ml	3000 ml 100ml
Color del agua	Gris	Marrón oscuro

4.1.3. Tratamiento de bioacumulación 25°C

El tratamiento fue realizado en un caldo nutritivo con un inóculo de *P. putida*, fueron sometido a agitación de 150 rpm, pH 7, y a temperatura de 25°C. Se tomo muestras cada 12 horas, durante 10 días.

Tabla 5: Datos de biomasa y sustrato del caldo nutritivo que contiene *P. putida* durante 312 h, en el tratamiento a 25°C

Tiempo	tiempo (Hora)	Tratamiento 25°C			Desv. Estándar	
		X(g/L)	S(g/L)	Ln (x)	X(g/L)	S(g/L)
0	12	0.077	11.865	-2.56394986	0.00556776	0.09605309
2	24	0.149	11.413	-1.90380897	0.00264575	0.10478519
4	48	0.566	10.156	-0.5697503	0.01903506	0.15455815
6	72	1.289	9.115	0.25386672	0.04026164	0.16678309
8	96	2.272	6.549	0.8208072	0.04010403	0.13447433
10	120	3.571	4.291	1.27284567	0.03269557	0.08732099
12	144	4.559	3.739	1.5171033	0.04493328	0.02444988
14	168	4.733	3.524	1.55448882	0.04473626	0.2113168
16	192	4.882	3.078	1.58548669	0.04735328	0.25585051
18	216	4.332	2.410	1.46595238	0.03153305	0.34928397
24	312	1.719	0.701	0.5415488	0.09916821	0.17574485

La tabla 5, presenta el peso en gramos de biomasa y sustrato a diversos tiempos durante 312 horas del tratamiento de 25°C. Asimismo, datos de desviación estándar de las tres réplicas de 25°C. Se graficó Ln (x) vs tiempo, con la finalidad de obtener el U_{max} o velocidad de crecimiento máxima en la cinética de crecimiento de *Pseudomona putida*, Posteriormente se determinó el Rendimiento sobre el sustrato o Y_{x/s}, con los datos obtenidos de biomasa y sustrato en g/L.

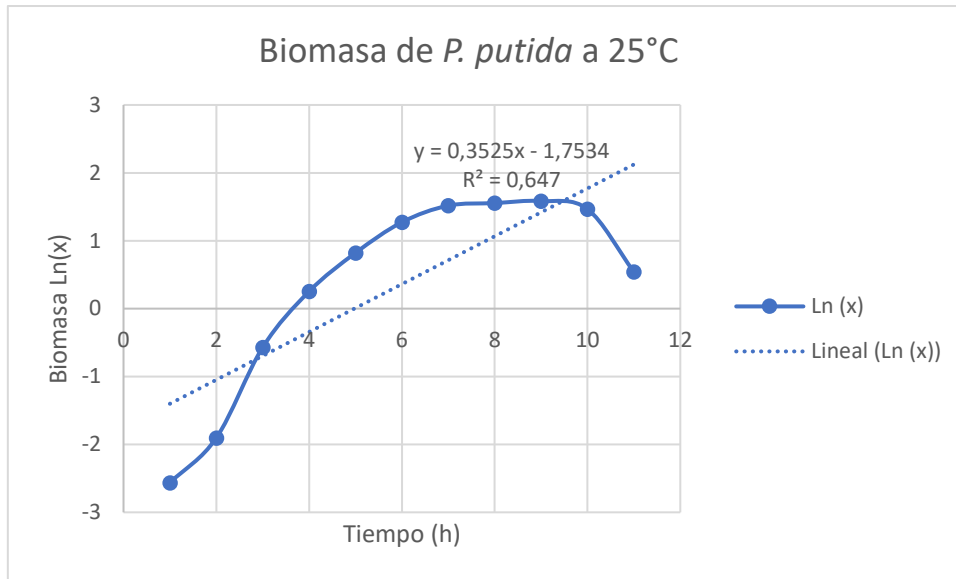


Figura 11. Cinética de crecimiento de *Pseudomona putida* de tratamiento 25°C, Biomasa Ln(x) vs t(h)

De tal manera se presentan a continuación una pequeña tabla con los datos obtenidos, datos que se van a plasmar el Software Wolfram Mathematica 10.4, además de otros datos necesarios como concentración sustrato, biomasa inicial y tiempo.

Tabla 6: Datos obtenidos para la cinética de Monod del tratamiento a 25°C

U_{max}=	0.3525	h⁻¹
Y_{x/s}=	0.147051775	g/gh
k_s=	5	g/L

Usando el software Mathematica se pudo determinar la cinética de crecimiento vs consumo de sustrato a través del tiempo, donde se puede apreciar que la biomasa tiene un ascenso hasta un promedio de 4.5 a 5 g/L. (**Ver anexo 12**)

4.1.4. Tratamiento de bioacumulación a 30°C

El tratamiento fue realizado en un caldo nutritivo con un inóculo de *P. putida*, fueron sometido a agitación de 150 rpm, pH 7, y a temperatura de 25°C. Se tomo muestras cada 12 horas, durante 10 días.

Las tres réplicas del tratamiento de 30 °C fueron promediadas, y se graficó la cinética de crecimiento de la bacteria.

Tabla 7: Datos de biomasa y sustrato del caldo nutritivo que contiene *P. putida* durante 312 h, en el tratamiento a 30°C

Tiempo	tiempo (Hora)	Tratamiento 30°C			Desv. Estándar	
		X(g/L)	S(g/L)	Ln(x)	X(g/L)	S(g/L)
0	12	0.091	11.784	-2.4005655	0.0015	0.0341
2	24	0.173	11.321	-1.75253876	0.0091	0.1406
4	48	0.676	10.055	-0.39205542	0.0361	0.5859
6	72	1.586	8.775	0.46142527	0.0571	0.3152
8	96	2.721	6.038	1.00099946	0.1057	0.2559
10	120	3.853	3.803	1.34893857	0.0508	0.1214
12	144	5.016	2.514	1.6126328	0.0311	0.1301
14	168	5.504	1.974	1.7054751	0.0165	0.0271
16	192	5.751	1.546	1.74931579	0.0461	0.0533
18	216	5.449	1.043	1.69543211	0.0342	0.0306
24	312	2.019	0.253	0.70243723	0.1046	0.0590

De igual manera en la tabla 7 se presenta el peso en gramos de biomasa y sustrato a diversos tiempos durante 312 horas del tratamiento de 25°C. Asimismo, datos de desviación estándar de las tres réplicas de 30°C.

Tabla 8: Datos obtenidos para la cinética de Monod a 30°C

umax	0.353	h-1
Yxs	0.16720446	g/gh
Ks	5	g/L

Se graficó Ln (x) vs tiempo, con la finalidad de obtener el Umax o velocidad de crecimiento máxima en la cinética de crecimiento de *P. putida*, Posteriormente se determinó el Rendimiento sobre el sustrato o Y x/s, con los datos obtenidos de biomasa y sustrato en g/L.

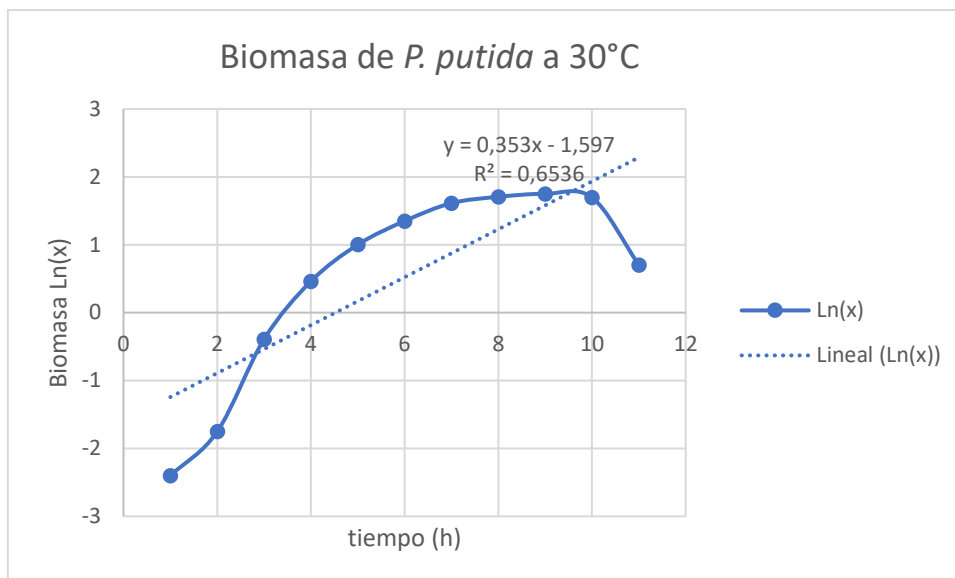


Figura 12. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas putida* 30°C, Biomasa Ln(x) vs t(h)

La velocidad de crecimiento máxima de la réplica 30°C presenta una mínima diferencia a comparación de la velocidad de crecimiento en el tratamiento de 25°C. Así mismo el rendimiento de sustrato se vio acelerado en el tratamiento de 30°C con una diferencia significativa de 0.2 h⁻¹ sobre el rendimiento de sustrato en el tratamiento de 25°C

Usando el software Mathematica se pudo determinar la cinética de crecimiento vs consumo de sustrato a través del tiempo, donde se puede apreciar que la biomasa tiene un ascenso hasta un promedio de 5 a 5.8 g/L. (**Ver anexo 13**).

La biomasa esperada era de 6 g/L, a una temperatura de 25°C del cual se obtuvo un promedio de 4.5 g/L, mientras que a una temperatura de 30°C se obtuvo un promedio de biomasa de 5.6 g/L, siendo esta temperatura la óptima para bioacumulación y para crecimiento microbiano. El Y x/s en el tratamiento de 30°C es mayor con 0.16 g/gh a diferencia del tratamiento de 25°C que presenta 0.14 g/gh, debido al mayor crecimiento microbiano presente en la muestra. Según Harikrishna y Narasimhulu, A condiciones de 25°C durante 7 días logró una bioacumulación de un 93% en agua sintética a una concentración de 10mg/l Cd. En los ensayos de esta investigación, a una concentración de 3.80 ppm, se logró una reducción de cadmio de hasta un 76% a una temperatura de 25°C durante 10 días.

4.1.5. Resultados de análisis de bioacumulación

Tabla 9: Resultados obtenidos de la bioacumulación de cadmio de ambos tratamientos.

Tiempo	control	Desv. Estándar	25°C	Desv. Estándar	30°C	Desv. Estándar
0	3.8 ppm	5.43896E-16	3.79 ppm	0.011547005	3.79 ppm	0.01154701
48	3.51 ppm	0.005773503	3.37 ppm	0.05033223	3.24 ppm	0.05507571
96	3.2 ppm	0.011547005	2.82 ppm	0.04163332	2.73 ppm	0.07
144	2.79 ppm	0.035118846	2.34 ppm	0.02081666	2.05 ppm	0.0057735
192	2.3 ppm	0.01	1.89 ppm	0.047258156	1.46 ppm	0.06506407
240	1.54 ppm	0.01	0.93 ppm	0.005773503	0.44 ppm	0.0057735
288	1.53 ppm	0.02081666	0.91 ppm	0.005773503	0.41 ppm	0.0057735

En el estudio comparativo de realizado por Saba shammin , Abdul Rehman Y Mahomoon. Entre *Pseudomona putida* y *Cuapriavidus metallidurans*, realizaron un tratamiento en agua sintética y en agua de residuo industrial con una concentración de cadmio, logrando en *Pseudomonas putida*, una mayor eficiencia en la reducción de cadmio de hasta 93 g mg/L⁻¹, después de un proceso de 4 días en biorreactores a una temperatura de 30°C. En el presente estudio se demostró un porcentaje de bioacumulación de 80% a una temperatura de 30°C logrando reducir un promedio de 3.2 ppm, durante un proceso de 10 días.

Tabla 10: Concentración inicial y final de cadmio en cada tratamiento, más el porcentaje de eficiencia de bioacumulación de cadmio en cada tratamiento.

	Blanco	25 °C	30 °C
Inicial	3.8	3.79	3.79
Final	1.53	0.91	0.41
% Eficiencia	59.7 %	76 %	89.2 %

Como resultado final de los tratamientos podemos decir que nuestro tratamiento blanco tuvo una eficiencia de 59.7% a una temperatura ambiente 17±3, como se logra visualizar en la tabla 10, nuestro tratamiento a 25°C se obtuvo una eficiencia de bioacumulación de 76% y finalmente nuestra temperatura óptima

para la bioacumulación de cadmio fue de 30°C, logrando una bioacumulación promedio de 89.2%

Analizaremos a continuación la variación de los resultados en la hora 288 de los tratamientos de bioacumulación de cadmio. Que es la hora final del proceso de los tratamientos de bioacumulación de cadmio. Cabe mencionar que N= número de repeticiones del tratamiento, en los 3 tratamientos suman un total de 9 repeticiones.

4.1.6. Análisis Estadístico

Tabla 11. Datos estadísticos del análisis de resultados de la bioacumulación de cadmio de los tratamientos: control, 25°C y 30 °C a la hora 288 de los tratamientos

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
Control	3	1,5367	,02082	,01202	1,4850	1,5884
25°C	3	,9133	,00577	,00333	,8990	,9277
30°C	3	,4133	,00577	,00333	,3990	,4277
Total	9	,9544	,48752	,16251	,5797	1,3292

A continuación, haremos el análisis ANOVA de los tratamientos de bioacumulación de cadmio y sus réplicas en la hora 288.

Tabla 12. Datos de máximos y mínimos de concentración de cadmio, de los tratamientos de bioacumulación de cadmio a 25°C, 30°C y control a la hora 288

	Mínimo	Máximo
Control	1,52	1,56
25°C	,91	,92
30°C	,41	,42
Total	,41	1,56

En la tabla 16, se muestran los datos de máximos y mínimos de concentración de cadmio en la hora 288 del tratamiento de bioacumulación de cadmio, tal como se ve el dato mínimo de concentración de cadmio lo tiene la temperatura 30°C. Corroborando así con el análisis de máximos y mínimos, que la temperatura óptima para la bioacumulación de cadmio es el tratamiento de bioacumulación a 30°C.

Tabla 13. ANOVA del diseño factorial de los tratamientos de bioacumulación de cadmio: temperatura ambiente, 25°C y 30 °C, a la hora 288

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,900	2	,950	5701,267	,000
Dentro de grupos	,001	6	,000		
Total	1,901	8			

En la tabla 13, se muestra el análisis de varianza (ANOVA) de los tratamientos de bioacumulación en entre grupos y dentro de grupos, con un nivel de significancia del 5%.

El valor P, resulto estar dentro de la significancia estadística, (valor $p=0.000 < 0.05$). Esto significa que los tratamientos de bioacumulación de cadmio en la hora 288 tienen diferencias significativas en la concentración de cadmio.

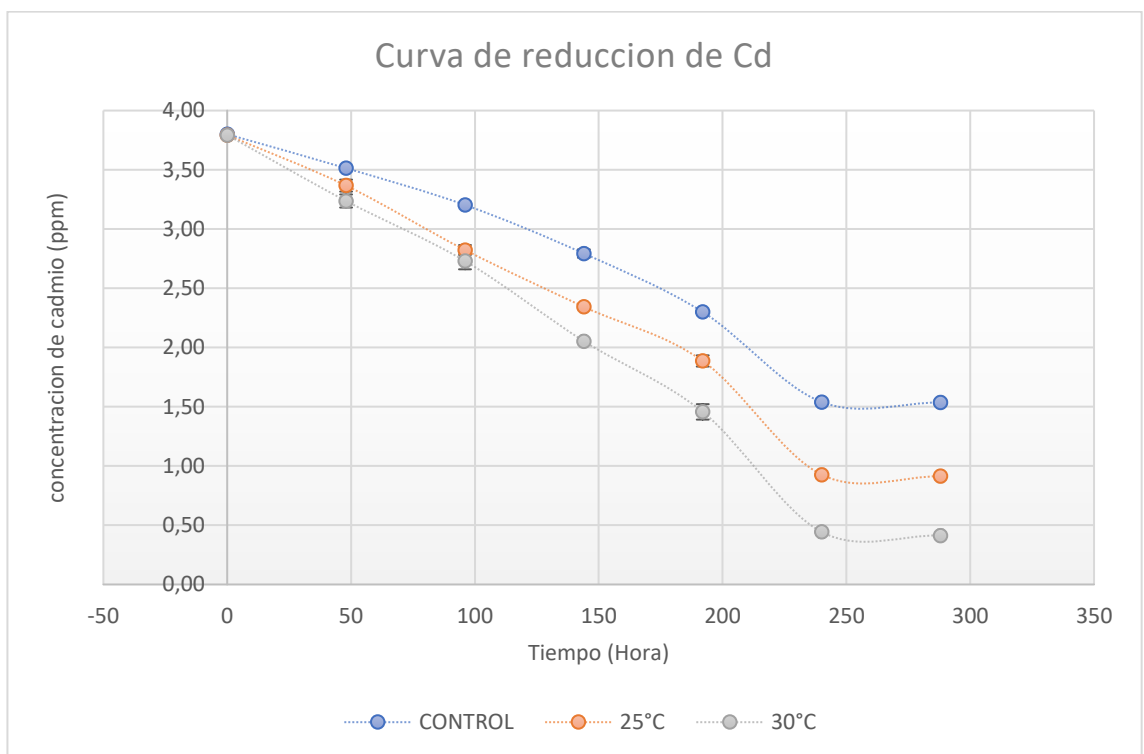


Figura 13. Curva de reducción de cadmio en los distintos tratamientos realizados. Gráfica de concentración de cadmio vs horas

Utilizando el programa SPSS 25 y el programa Excel 2019 se obtuvo como resultado al 95% que el tratamiento a temperatura de 30°C es capaz de bioacumular cadmio a un 80.2%, después de 10 días de tratamiento, en cual se

llegó a reducir a 0.41 mgCd/L(ppm) de una muestra inicial de 3.8 mgCd/L(ppm), por lo tanto, en el tratamiento de una temperatura de 25°C, se encontró en un segundo subconjunto que llegó a reducir a 0.91 mgCd/L (ppm) por 10 días.

4.1.7. Determinación de concentración proteica

Para la curva de calibrado se realizaron las siguientes diluciones

Tabla 14: Solución de Bradford para la curva de calibrado de concentración proteica.

Tubo	BSA 10mg/ml (ul)	H₂O (ul)	Concentración (mg/ml)
Blanco	0	500	0
Tubo 1	25	475	0.5
Tubo 2	50	450	1
Tubo 3	75	375	2.5
Tubo 4	125	250	5
Tubo 5	375	125	7.5
Tubo 6	500	0	10

Se procedió a leer en espectrofotómetro a 595 nm. Después de 30 min

4.1.7.1. Método de Bradford

Se presenta los datos de la proteína que se expresa ante la presencia del cadmio para atraparlos dentro de la bacteria. A continuación, en la Tabla 15 se visualiza la concentración de la proteína en los tratamientos de 25°C y 30°C.

Tabla 15: Concentración de proteína en los tratamientos de 25° y 30°C.

Tubo	25°C		30 °C	
	Proteína (mg/ml)	Desv. Estándar	Proteína (mg/ml)	Desv. Estándar
1	0.44	0.069935685	0.71	0.112583302
2	0.76	0.101908456	0.95	0.077783889
3	1.63	0.256678788	2.15	0.120253898
4	2.53	0.165506294	3.52	0.450526729
5	3.99	0.103452082	4.99	0.273119632
6	7.17	0.386797535	8.04	0.071923571

4.1.7.2. Concentración de Proteína vs Bioacumulación 25°C

Teniendo en cuenta que la bioacumulación es un mecanismo de resistencia a Cadmio, por medio de las proteínas. Se pretende determinar la correlación que hay entre la reducción de cadmio y la concentración de proteínas.

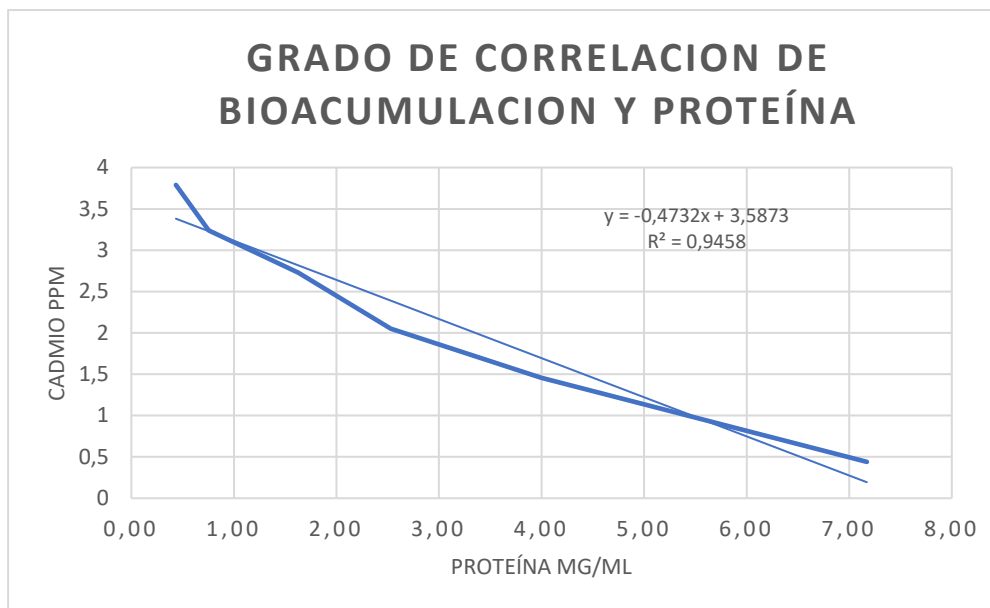


Figura 14. Grafica de Correlación de bioacumulación vs proteína a 25°C

4.1.7.3. Concentración proteica vs bioacumulación a 30°C

Con los datos obtenidos en el tratamiento de 30°C se procedió a realizar la gráfica concentración de cadmio (ppm) con la concentración de proteína (gm/ml)

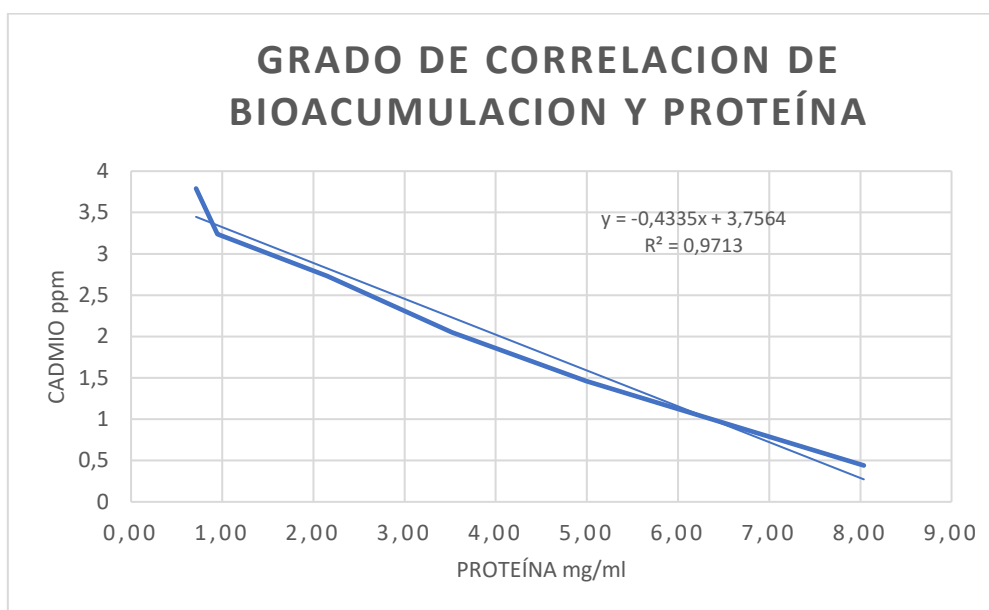


Figura 15. Gráfica de Correlación de bioacumulación vs proteína a 30°C

Se puede observar una mayor correlación de Proteína – bioacumulación, en la réplica de 30°C. Determinando así que, a más concentración de proteína, hay un mayor porcentaje de reducción de Cadmio.

La concentración de proteínas esta correlacionado con el porcentaje de bioacumulación a 30°C, llegando a una correlación de hasta 0.98 a diferencia de la correlación hasta 0.95 en 25°C. Se puede decir además que la concentración de proteínas está estrechamente relacionada con el porcentaje de bioacumulación de cadmio, este a su vez relación con la cantidad de biomasa microbiana producida.

4.1.8. Neutralización de cadmio

La cal hidratada es uno de los componentes más comunes usados para neutralizar los contaminantes producto de las mineras, son muchos los factores que influyeron para un correcto resultado de neutralización. Como temperatura, concentración de la cal, la agitación, el pH, el tiempo de exposición a la cal. Considerando estos factores importantes se puede lograr una neutralización de hasta un 98%.

Se filtra el sobrenadante con papel filtro simple, y la cal sólida que contiene los sólidos disueltos de la muestra será llevada al PROMAS, una entidad encargada de brindar servicios ambientales.



Figura 16. Proceso de Neutralización con Cal Hidratada

La cal hidratada es una base fuerte, considerada uno de los alcalinizantes más económicos, de fácil adquisición (Lozano, 2006; Torres et al. 2008) y más utilizado para neutralizar los contaminantes libres, elevando la alcalinidad para ajustar el pH de agua adecuado. Con el método de bioacumulación se logró concentrar el cadmio presente en muestras de

agua de río, para posteriormente neutralizarla con cal hidratada, reduciendo así el gasto de cal hidratada y reduciendo la contaminación, que haciéndolo directamente.

V. CONCLUSIONES

- Según los análisis realizados en la Universidad Nacional de Trujillo en las instalaciones del Laboratorio LASACI, la muestra recolectada de efluentes mineros vertidos en el valle de Chuquicara, llega a una concentración de 3.80 ppm de cd, siendo altamente tóxicos para la población de la zona. Según la Autoridad Nacional del Agua, la concentración permisible en ríos y lagos es de 0.003ppm de cd.
- La prueba de resistencia de cd con concentraciones de 144 ppm y 445ppm en *P. putida* aislada de efluentes mineros vertidos en el valle de Chuquicara, se demostró que la concentración de 144 ppm es tolerable para la bacteria, mientras que la concentración de 445 ppm, no se evidenció resistencia. Concluyendo así que la concentración de 445 ppm de cadmio es tóxica para *P. putida*.
- En el ensayo de bioacumulación con células vivas y bioadsorción con células secas, se demostró que en el proceso de bioacumulación *P. putida* se logró una reducción de cadmio acabo de 5 días de 2.05 ppm, mientras que el proceso de bioadsorción se obtuvo una concentración 0.03 ppm de cadmio. Demostrando así que el proceso de bioacumulación con *P. putida* es únicamente viable como células vivas. Según la teoría, se puede concluir además que el proceso de bioacumulación actúa como un mecanismo de resistencia a los metales pesados, es un proceso propio de *P. putida*.
- Los datos obtenidos de los tratamientos de 25°C y 30°C del rendimiento biomasa obtenida fue de 0.147 y 0.167 respectivamente para cada tratamiento. En ambos casos de evidenció un crecimiento bacteriano pero el que destacó es el tratamiento de 30°C.
- Realizados los ensayos en *P. putida* a temperaturas de 25°C y 30°C, se muestra como resultado una mayor bioacumulación de cadmio a 30°C, siendo una temperatura óptima de *P. putida* logrando una reducción promedio del metal pesado en 0.5 ppm adicional, a diferencia del tratamiento a 25°C.

- Se concluye a través del trabajo de investigación que la temperatura óptima para lograr un mayor porcentaje de bioacumulación de 30°C, logrando bioacumular un total de 80%.

VI. RECOMENDACIONES

- Para la toma de muestra del agua de río contaminado, se recomienda tomar las medidas adecuadas de seguridad, como guantes, zapatos antideslizantes, además un brazo muestreador para zonas empinadas en el río, un GPS para la identificación exacta del lugar a muestrear y frascos de polipropileno.
- Se recomienda realizar técnicas de biología molecular en un laboratorio certificado, para su identificación y codificación de la bacteria *P. putida* para darle mayor fiabilidad al proyecto de investigación.
- Se sugiere realizar la prueba de resistencia de la bacteria con el cloruro de cadmio con diferentes concentraciones superiores a 140ppm en un rango de 10 a 20ppm de diferencia. Para determinar la capacidad máxima de resistencia de cloruro de cadmio. Así mismo evaluar su cinética de crecimiento en las distintas concentraciones para evaluar la reacción de *P. putida* ante elevadas concentraciones.
- Para las próximas investigaciones en este campo, se recomienda realizar el ensayo *in situ*, para determinar la eficiencia de *P. putida* en condiciones climáticas variadas. Utilizando metodologías como la inmovilización de bacterias empleando esferas de alginato.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahuja V., Vohra P., Kashyap D., Tewari R. (2001). Adsorption of heavy metals (Pb+2 and Cd+2). by free and immobilized biomass of *Acinetobacter anitratus*. 41:275-279.
- Ahumada R. (1994). NIVEL DE CONCENTRACION E INDICE DE BIOACUMULACION PARA METALES PESADOS (Cd, Cr, Hg, Hg, Ni, Cu, Pb y Zn) EN TEJIDOS DE INVERTEBRADOS BENTICOS DE BAHI SAN VICENTE, CHILE. *Rev. Biol. Mar. Valparaiso*, 29(1):77-87
- ANA (2016). Protocolo nacional para el monitoreo de la calidad de los recursos hídricos superficiales. Revisado: <https://hdl.handle.net/20.500.12543/209>
- Ángeles M. (2008). Caracterización y aplicación de biomasa residual a la eliminación de metales pesados. (Tesis Doctoral). Universidad de Granada Facultad de Ciencias. Dpto. de ingeniería Química.
- Anzai Y, Kim H & Wakabayashi H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonas based on 16Rrna sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1563-89. PMID 10939664.
- Anzai Y, Kudo Y & Oyaizu H. (1997). La filogenia de los géneros *Chryseomonas*, *Flavimonas* y *Pseudomonas* apoya la sinonimia de estos tres géneros. PMID 9103607
- Arnáiz C., Isac L. & Lebrato J., (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos: Métodos directos e indirectos. Univ. de Sevilla. pp. 45-47
- Astete J, Gastañaga M, Pérez D. (2010). Niveles de metales pesados en el ambiente y su exposición en la población luego de cinco años de exploración minera en Las Bambas, Perú. *Revista Perú. Med. Exp. Salud pública*. 2014 Julio; 31(4): 1-4
- Becerra C. (2007) OPTIMIZACION DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE BIOMASA DE LA CEPA *Pseudomonas putida* UA 44 AISLADA DEL SUELO BANADERO DE URABA- ANTIOQUIA. Universidad de EAFIT: Escuela de Ingeniería; Departamento de Ingeniería de Procesos Medellín, pág. 42.

- Bedoya, J., Castaño, G. & Ochoa, S. (2019) Tolerancia al plomo de aislamientos nativos de *Pseudomonas spp* de aguas residuales del Valle de Aburrá. Colombia. Rev Colomb.biote. vol11(1), 16-76.
- Beltrán, M. & Gómez, A. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética. Univ Militar Nueva Granda. Vol. 12(2).
- Beltrán, M. & Gómez, A. (2015). Metales pesados (Cd, Cr y Hg): su impacto en el ambiente y posibles estrategias biotecnológicas para su remediación. Revista I3+. 2 (2), 82-112.
- Bradford, M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry pp. 248
- Capó, M. (2007) Principios de ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. Editorial Tebar.
- Cervantes, C., Saldaña, A., Acevedo, F., León, I., Rivera, M., Ávila, M., Wrobel, K., Guitierrez, J. Rodriguez, J. & Moreno, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados vol. 48, Revista Latinoamericana de MICROBIOLOGIA.
- Chien, C., Lin, C. & Wu, C. (2013). Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas sp*. Biochemical Engineering Journal, 78, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.014>.
- Ertola, R., Giulietti, A. & Castillo, F. (1995). Design Formulation, and Optimization of Media. Bioreactor System Design, Marcel Dekker, New York. Pp. 89-137
- Stainer, Y., Doudoroff, M. & Edward. A. (1981). Microbiología. Aguilar España
- Ferran, A. (1996). SPSS para Windows, Programación y Análisis Estadístico. Editorial: McGraw-Hill. México. 580pp
- Flemming, H. & Wilderer P. (1998). Microorganisms and their role in soil. En: Bioremediation: Principles and Practice. Technomic Publication. Pennsylvania, Estados Unidos. (1) p.283- 332

- Golovleva, L., Aharonson, R., Greenhalg, N., Sethunathan, N. y Vonk, W. 1990. The role and limitations of microorganism in the conversion of xenobiotics. *Puer and apl. Chem* 62: 351-364.
- Greated, A., Lambertsen, L., Williams, P. & Thomas C.M. (2002). Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 4 (12): 856-871.
- Günther, V., Lindert, U. & Schaffner W. (2012) The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochim Biophys Acta*, 1823:1416-1425.
- Haq, F., Mahoney M & Koropatnick, J. (2003) Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res*, 533:211-226.
- Harikrishna, Y. & Narasimhulu K. (2012). STUDIES ON BIOSORPTION OF CADMIUM BY *Pseudomonas putida*. *IJERA* 3(2): 2217-2219
- Hernandez, S. (2014) Regulación del metabolismo del carbono en *pseudomonas putida*. (Tesis).Univ. Autonoma de madrid, España.
- Higham, D., Sandler, P. & Scawen, M. (1995). Cadmium Resistance in *Pseudomonas putida*: Growth and Uptake of Cadmium. *Jour. of Gnrl. Microb.* 131 2539- 2544
- Jarosławiecka, A. & Piotrowska-Seget, Z. (2014). Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology (United Kingdom)*, 160, 12
- Kojima Y. (1991). Definitions and nomenclature of metallothioneins. En: *Methods in Enzymology*(E. J. Riordan y B. Valle, Eds.). Vol. 205, American Press, San Diego.
- Lenntech, W. (2014). “Cadmium.” en línea: (<https://www.lenntech.es/periodica/elementos/cd.htm>) 07-12-2004:1pp.
- Lovley, R. (2000) *Environmental Microbe-Metal Interactions*. Washington D.C.: American Society for Microbiology.
- Kahlon, R. (2016). *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. India: Springer International Publishing AG Switzerland.
- Madigan, M. & Martinko, J. (2005). *Brock Biology of Microorganism* (11th ed. Edición). Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1
- Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *NCBI*: 30(2):261-78.

- Martín, M. (2008). Caracterización y aplicación de biomasa residual a la eliminación de metales pesados. Tesis Doctoral: Universidad de Granada Facultad de Ciencias. Dpto. de ingeniería Química.
- Martínez, K., Souza, V., Bucio, L., Gómez, L. & Gutiérrez, M. (2013). Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta Toxicol Argnet*, 21(1), 33-49.
- Marrero, J., & Coto, P. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC : Ciencias Biológicas*, 41(1), 67-78.
- Mejía, G. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria Y Zootecnia*, 1(1), 77-99. Disponible: <https://www.redalyc.org/29pdf/3214/321428096010.pdf>
- Moore, E., Tindall, B., Martins, V., Pieper, D., Ramos, J., Palleroni, N. (2006). Nonmedical: *Pseudomonas*. *Prokaryotes*, 6:646-703.
- Newman. M. (2014) *Fundamentals of Ecotoxicology: The Science of pollution*. Fourth Edition. CRC Press. New York. 633pp
- Naik, M., & Dubey, K. (2011). Lead-enhanced siderophore production and alteration in cell morphology in a Pb-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain 4EA. *Current Microbiology*, 62(2), 409-414. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9722-2>.
- Nies, D. (2003) Efflux- mediate heavy metal resistance in prokaytes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:313- 339
- Nies, D & Silver S. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51:7,30-50.
- Osorio, L., Tovar, A., Fortoul, G., Palacios, A. & Lilia A. (1997). Introducción a la toxicología ambiental. *Meteppec; ECO: 13: 211-26*
- Palomino, C. & Gonzáles, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev. Scielo Perú*. Disponible:http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020

- Panigatti, M., Torres, J., Griffa, C., Boglione, R. & Gentinetta, F. (2007). Biorremediación de efluentes con cromo (VI) proveniente de plantas metalmeccánicas. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica*, 1 (2), 1-13.
- Paredes, K., Santillán, L. & Viteri, M. (2021). Capacidad degradadora de pseudomonas aeruginosa frente a metales pesados presentes en muestras de sedimentos del río Chibunga. *Pol. Con.* (58) Vol. 6, No 5.
- Palleroni, N., Garrity, G., Boone, G. y Castenholz, R. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2 ed. Vol 2. Part B. Springer, Estados Unidos. pp. 323-379
- Pérez, P. & Azcona, M. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico Quirúrgicas*, 17(3), 199-205.
- Rajendran, P., Muthukrishnan, J.v & Gunasekaran, P. (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41: 935-944.
- Ramírez, A. (2002). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Fac de Med Univ Nac Mayor de Sn Marcos*. 63:51-64.
- Ramteke, P. (2000). Biosorption of Nickel (II) by *Pseudomonas stutzeri*. *J Environ Biol*, 21:219-221.
- Shamim S., Rehman A., Qazi MH. (2014). Cadmium-resistance mechanism in the bacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34 and *Pseudomonas putida* mt2. (Internet). 2014 ago. (Citado el 20 de dic. del 2022)67(2):149-57. Disponible en:

VIII. ANEXOS

Anexo 1: 7.1.1. Datos de Absorbancia Cinética de crecimiento de Replicas I, II y III de 25 y 30°C

Tiempo	Horas	REPLICA I 25 °C	REPLICA II 25°C	REPLICA III 25°C	REPLICA I 30°C	REPLICA II 30°C	REPLICA III 30°C
0	0	0	0	0	0	0	0
1	12	0.054	0.056	0.061	0.061	0.069	0.067
2	24	0.149	0.147	0.152	0.163	0.165	0.183
3	36	0.259	0.254	0.264	0.356	0.341	0.365
4	48	0.562	0.546	0.567	0.631	0.635	0.704
5	60	0.968	0.945	1.012	1.31	1.235	1.345
6	72	1.256	1.245	1.324	1.547	1.523	1.634
7	84	1.546	1.534	1.615	1.881	1.835	1.923
8	96	2.256	2.234	2.314	2.73	2.605	2.812
9	108	2.884	2.876	2.912	3.313	3.124	3.456
10	120	3.546	3.596	3.534	3.856	3.824	3.912
11	132	4.335	4.342	4.332	4.14	4.62	4.52
12	144	4.602	4.596	4.572	4.933	5.023	5.043
13	156	4.682	4.694	4.612	5.102	5.363	5.253
14	168	4.712	4.702	4.712	5.35	5.523	5.496
15	180	4.731	4.71	4.842	5.503	5.613	5.621
16	192	4.85	4.83	4.923	5.713	5.701	5.792
17	204	4.981	4.94	5.123	5.799	5.812	5.912
18	216	4.31	4.304	4.296	5.483	5.423	5.492
19	228	3.823	3.95	3.735	4.915	4.912	4.902
20	240	3.123	3.234	2.958	4.32	4.572	4.103

Anexo 2: Datos de biomasa y sustrato expresado en g/L de Replicas I, II y III de 25°C

Tiempo	tiempo (Hora)	25°C Replica I		25°C Replica II		25°C Replica III	
		X(g/L)	S(g/L)	X(g/L)	S(g/L)	X(g/L)	S(g/L)
0	12	0.082	11.865	0.078	11.961	0.071	11.769
2	24	0.148	11.413	0.147	11.517	0.152	11.308
4	48	0.584	10.156	0.546	10.311	0.567	10.002
6	72	1.298	9.115	1.245	9.282	1.324	8.948
8	96	2.269	6.549	2.234	6.414	2.314	6.683
10	120	3.583	4.291	3.596	4.378	3.534	4.203
12	144	4.509	3.739	4.596	3.763	4.572	3.714
14	168	4.784	3.524	4.702	3.735	4.712	3.313
16	192	4.892	3.078	4.83	3.334	4.923	2.822
18	216	4.366	2.410	4.304	2.759	4.325	2.061
24	312	1.821	0.859	1.623	0.732	1.712	0.512

Anexo 3: Datos de biomasa y sustrato expresado en g/L de Replica I, II y III de 30°C

Tiempo	tiempo (Hora)	30°C Replica I		30°C Replica II		30°C Replica III	
		X(g/L)	S(g/L)	X(g/L)	S(g/L)	X(g/L)	S(g/L)
0	12	0.092	11.784	0.089	11.750	0.091	11.818
2	24	0.172	11.321	0.165	11.462	0.183	11.180
4	48	0.688	10.055	0.635	10.641	0.704	9.469
6	72	1.602	8.775	1.523	9.090	1.634	8.459
8	96	2.746	6.038	2.605	6.294	2.812	5.782
10	120	3.824	3.803	3.824	3.681	3.912	3.924
12	144	4.982	2.514	5.023	2.384	5.043	2.644
14	168	5.493	1.974	5.523	1.947	5.496	2.001
16	192	5.759	1.546	5.701	1.600	5.792	1.493
18	216	5.445	1.043	5.485	1.013	5.417	1.074
24	312	2.121	0.253	2.023	0.194	1.912	0.312

Anexo 4: Datos de concentración proteica del tratamiento a 25°C

Tubo	1 Replica 25°C		2 Replica 25°C		3 Replica 25°C	
	Absorbancia	Concentración (mg/ml)	Absorbancia	Concentración (mg/ml)	Absorbancia	Concentración (mg/ml)
1	0.018	0.5	0.013	0.361	0.016	0.444
2	0.035	0.778	0.029	0.644	0.038	0.844
3	0.053	1.577	0.047	1.399	0.064	1.905
4	0.091	2.708	0.08	2.381	0.084	2.5
5	0.143	4.109	0.138	3.966	0.136	3.908
6	0.252	7.2	0.237	6.771	0.264	7.543

Anexo 5: Datos de concentración proteica del tratamiento a 30°C

Tubo	1 Réplica 30°C		2 Réplica 30°C		3 Réplica 30°C	
	Absorbancia	Concentración (mg/ml)	Absorbancia	Concentración (mg/ml)	Absorbancia	Concentración (mg/ml)
1	0.021	0.583	0.028	0.778	0.028	0.778
2	0.039	0.867	0.043	0.956	0.046	1.022
3	0.068	2.024	0.073	2.173	0.076	2.262
4	0.101	3.006	0.125	3.72	0.129	3.839
5	0.164	4.713	0.174	5	0.183	5.259
6	0.284	8.114	0.279	7.971	0.281	8.029

Anexo 6: Preparación del Reactivo BRADFORD

- Disolver 5mg de azul comassie en 2,5 ml de etanol 96%.
- Añadir 5 ml de ácido ortofosforico 85%.
- Diluir hasta 50 ml con H2O destilada
- Dejar reposar 24 horas en oscuridad y filtrar dos veces con papel de filtro “conservar en botella oscura no más de 15 días”

Anexo 7: Preparación del Reactivo DNS

- Agregar 30 gr de tartrato de sodio y 35 ml H2O destilada en un vaso de precipitación
- Agregar el agitador magnético al vaso precipitado
- Agregar 1 gr de DNS y 20 ml de H2O
- Llevar a una fiola y aforar a 100 ml
- El frasco se guarda en refrigeración.

Anexo 8: Preparación de caldo Nutritivo

- Pesar 1gr de pluripectona y 0.6 gr de extracto de carne
- Suspender los componentes en 200 ml de H2O destilada
- Esterilizar en la autoclave 118-121°C durante 15 min.
- El medio es ajustado a un pH7

Anexo 9: Preparación de NaOH 20%

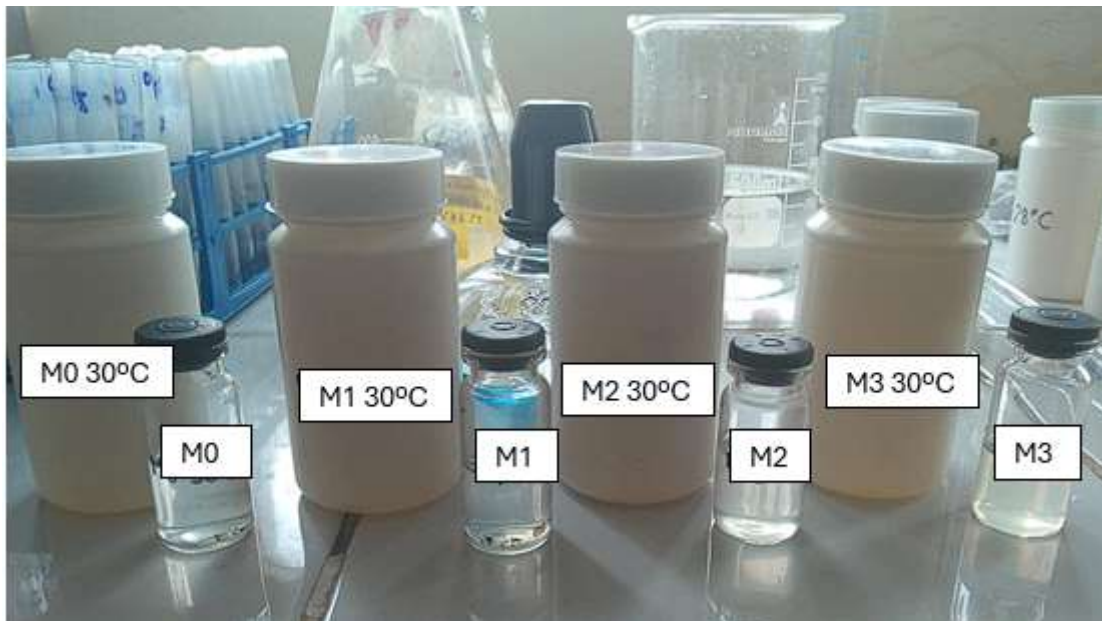
- Según la concentración 10 gr de NaOH por cada 100 ml de solución
 $\text{NaOH} = 100 \text{ ml} * (10 \text{ gr NaOH} / 100 \text{ ml}) = 10 \text{ gr NaOH}$
- 20 gr NaOH disolver en 20 ml de H2O destilada
- Aforar a 100 ml con un pH 7

Anexo 10: Preparación de agar nutritivo

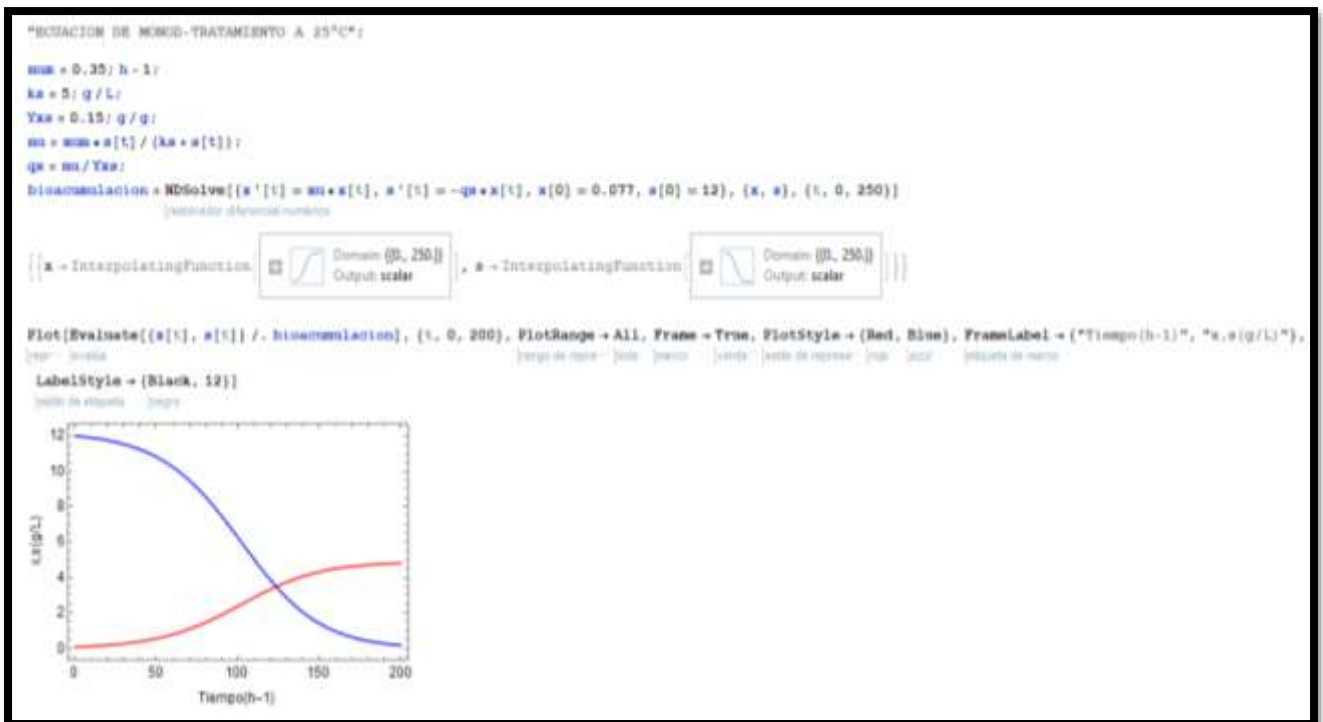
- Pesar 0.12 gr de extracto de carne, 0.4 gr peptona, 0.16 gr agar y 0.2 cloruro de sodio.
- Suspender los componentes en 40 ml de H2O.
- Reposar 5 min y calentar con agitación frecuente.

- Esterilizar en la autoclave 118-121°C durante 15 min.

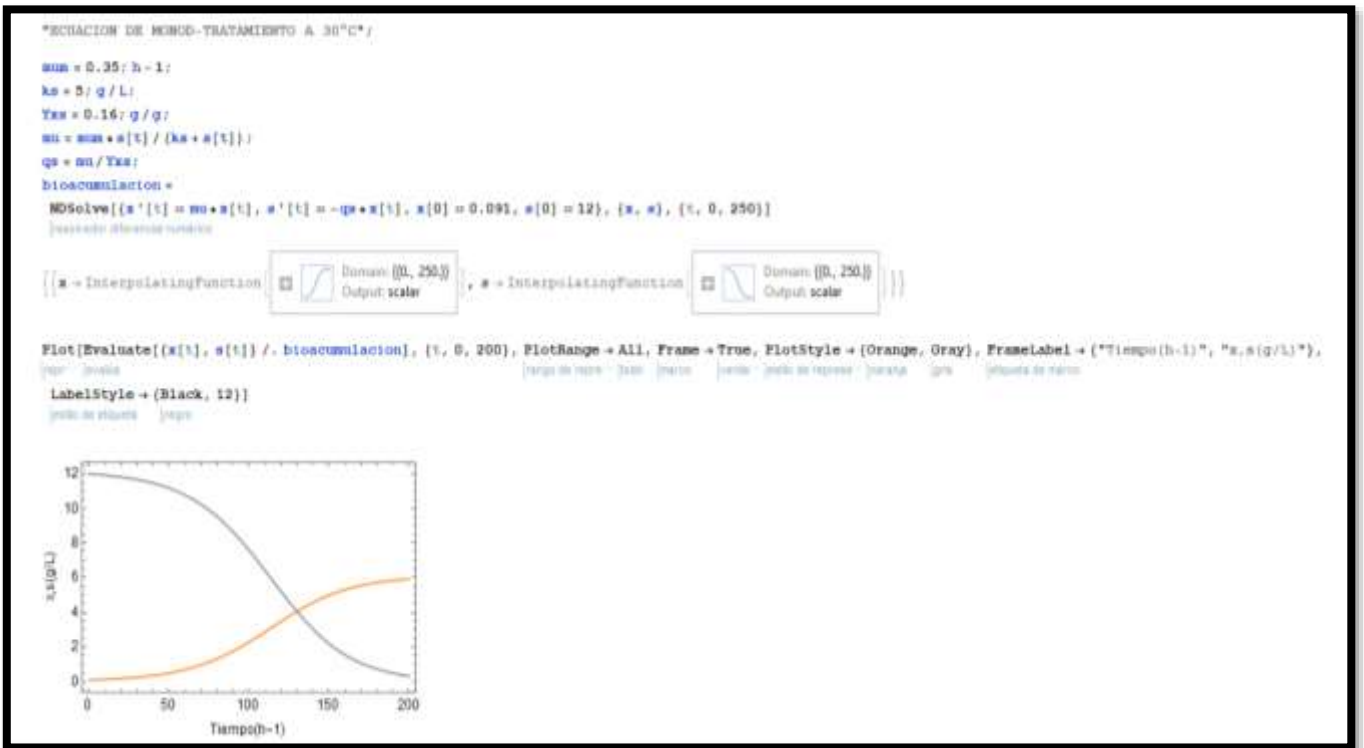
Anexo 11: Muestras para el análisis de absorción atómica y para lectura en espectrometría de luz visible en muestras de 30°C



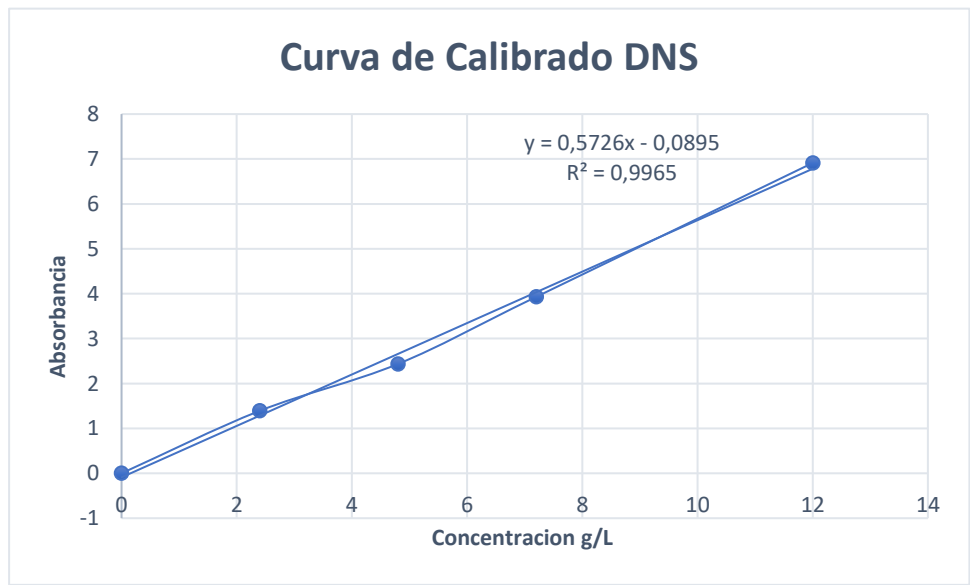
Anexo 12: Simulación de Cinética de crecimiento vs consumo de sustrato en Software Mathematica del tratamiento 25°C



Anexo 12: Simulación de Cinética de crecimiento vs consumo de sustrato en Software Mathematica, tratamiento 30°C



Anexo 13: Curva de calibrado DNS, absorbancia vs concentración g/L



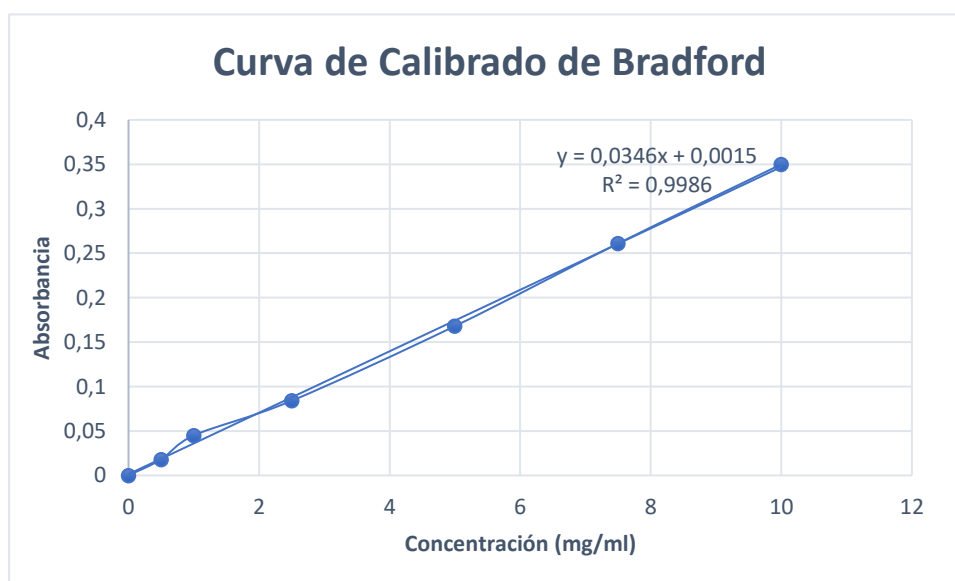
Anexo 14: Datos de absorbancia para determinar curva de calibración para DNS

Tubo N°	Sol. Madre	H2O	DNS	concentración g/ml	concentración g/L	Absorbancia
1	0	0.5	0.5	0	0	0
2	0.1	0.4	0.5	0.0024	2.4	1.392
3	0.2	0.3	0.5	0.0048	4.8	2.436
4	0.3	0.2	0.5	0.0072	7.2	3.93
5	0.5	0	0.5	0.012	12	6.912

Anexo 15: Datos de absorbancia obtenidos de espectrofotómetro de luz visible, para curva de calibrado.

Tubo	Concentración (mg/ml)	Absorbancia
Blanco	0	0
Tubo 1	0.5	0.018
Tubo 2	1	0.045
Tubo 3	2.5	0.084
Tubo 4	5	0.168
Tubo 5	7.5	0.261
Tubo 6	10	0.350

Anexo 16: Curva de calibrado para método Bradford, absorbancia vs concentración mg/ml.



Anexo 17: Reporte de análisis de Replica I, tratamiento a 25°C y 30°C



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
LABORATORIO DE SERVICIOS A LA COMUNIDAD E INVESTIGACION
LASACI



REPORTE DE ANÁLISIS

SOLICITANTE : DURÁND MORENO RUTH JACQUELINE
MUESTRA : AGUA DE RÍO
PROCEDENCIA : CHIMBOTE - RÍO SANTA
INGRESO DE MUESTRA : 06 DE AGOSTO DEL 2018

MUESTRA (REPLICA I)	MÉTODO	mg Cd/L
M1 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	3.78 ppm
M2 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	3.42 ppm
M3 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	2.87 ppm
M4 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	2.32 ppm
M5 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	1.94 ppm
M6 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	0.92 ppm
M7 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	0.91 ppm

MUESTRA (REPLICA I)	MÉTODO	mg Cd/L
M1 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	3.78 ppm
M2 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	3.18 ppm
M3 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	2.65 ppm
M4 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	2.06 ppm
M5 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	1.52 ppm
M6 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	0.45 ppm
M7 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	0.41 ppm

Trujillo 11 de Agosto del 2018


ING. NOÉ COSTILLA SÁNCHEZ
JEFE DE LABORATORIO



AGUAS - SUELOS - ALIMENTOS - MINERALES - ACEITE - CARBON - CAL

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA

949959632 - RPM: *0056432 - RPC: 949119298

Anexo 18: Reporte de análisis de la réplica II, del tratamiento de 25 y 30°C



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
LABORATORIO DE SERVICIOS A LA COMUNIDAD E INVESTIGACION
LASACI



REPORTE DE ANÁLISIS

SOLICITANTE : DURÁND MORENO RUTH JACQUELINE

MUESTRA : AGUA DE RÍO

PROCEDENCIA : CHIMBOTE - RÍO SANTA

INGRESO DE MUESTRA : 23 DE NOVIEMBRE DEL 2018

MUESTRA (REPLICA II)	MÉTODO	mg Cd/L
M1 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	3.80 ppm
M2 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	3.36 ppm
M3 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	2.81 ppm
M4 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	2.36 ppm
M5 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	1.85 ppm
M6 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	0.93 ppm
M7 25°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	0.92 ppm

MUESTRA (REPLICA III)	MÉTODO	mg Cd/L
M1 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	3.80 ppm
M2 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	3.32 ppm
M3 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	2.79 ppm
M4 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	2.35 ppm
M5 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	1.87 ppm
M6 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	0.93 ppm
M7 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	0.91 ppm

Trujillo 28 de noviembre del 2018



ING. NOÉ COSTILLA SÁNCHEZ
JEFE DE LABORATORIO



AGUAS - SUELOS - ALIMENTOS - MINERALES - ACEITE - CARBON - CAL

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA
949959632 - RPM: *0056432 - RPC: 949119298



LASACI

REPORTE DE ANÁLISIS

SOLICITANTE : DURÁND MORENO RUTH JACQUELINE
MUESTRA : AGUA DE RÍO
PROCEDENCIA : CHIMBOTE - RÍO SANTA
INGRESO DE MUESTRA : 23 DE NOVIEMBRE DEL 2018

MUESTRA (REPLICA II)	MÉTODO	mg Cd/L
M1 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	3.80 ppm
M2 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	3.24 ppm
M3 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	2.78 ppm
M4 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	2.05 ppm
M5 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	1.39 ppm
M6 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	0.44 ppm
M7 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	0.42 ppm

MUESTRA (REPLICA III)	MÉTODO	mg Cd/L
M1 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	3.80 ppm
M2 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	3.29 ppm
M3 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	2.76 ppm
M4 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	2.05 ppm
M5 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	1.46 ppm
M6 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	0.44 ppm
M7 30°C	ABSORCIÓN ATÓMICA- LLAMA	0.41 ppm

Trujillo 28 de noviembre del 2018


 ING. NOÉ COSTILLA SÁNCHEZ
 JEFE DE LABORATORIO



AGUAS - SUELOS - ALIMENTOS - MINERALES - ACEITE - CARBON - CAL

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA

949959632 - RPM: *0056432 - RPC: 949119298