



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



**Evaluación de la capacidad de remoción de cadmio mediante levaduras
(*Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus gastricus*), aisladas del volcán
Tungurahua.**

Proyecto de Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Marco Antonio Jácome Gavilánez.

Tutora: Ph.D. Nahir Yerely Dugarte Jiménez.

Ambato – Ecuador

Junio 2016

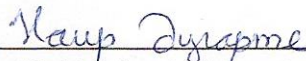
APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Nahir Yerely Dugarte Jiménez

CERTIFICA:

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

Ambato, 18 de Febrero del 2016.




Ph.D. Nahir Yerely Dugarte Jiménez

C.I. 175347919-3

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Marco Antonio Jácome Gavilánez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

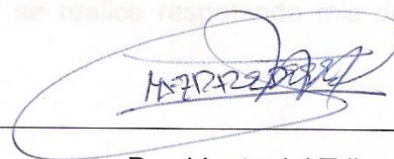


Marco Antonio Jácome Gavilánez
C.I. 050377806-0
AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Lic. Mg. Yunys Pérez Betancourt
C.I. 175647274-0



Ing. Mg. Manolo Alexander Córdova Suárez
C.I. 180284250-8

Ambato, 10 de Junio de 2016

DERECHOS DE AUTOR

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

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Sr. Marco Antonio Jácome Gavilánez
C.I. 050377806-0
AUTOR

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios por darme la oportunidad de vivir y guiarme por el buen camino y sobre todo darme fuerzas para seguir adelante.

A mis padres por sus consejos y su gran apoyo en los momentos difíciles y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar, ya que la mejor herencia es la educación.

A mis hermanos mayores que siempre han estado junto a mí, brindándome su apoyo, comprensión y muchas de las veces poniéndose en el papel de padres.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar doy infinitamente gracias a Dios, por haberme dado fuerza y valor para culminar esta etapa de mi vida.

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos, a sus autoridades, profesores y a todas las personas que hacen de esta institución digna de reconocimiento.

A la Ing. Mirari Arancibia Ph.D directora de la Unidad Operativa de Investigación y desarrollo (UODIDE) por permitirme desarrollar la parte experimental de mi tesis dentro de la unidad.

A la Lic. Nahir Dugarte, Ph.D, y al Químico Cesar Yambay por el tiempo, la paciencia y dedicación en el desarrollo de la investigación.

A la doctora Sandra Horvitz por el tiempo y el apoyo en la revisión de esta tesis.

A todas la personas que ayudaron de forma directa e indirecta en la realización de mi tesis.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

Portada	i
Aprobación del Tutor.....	ii
Declaración de Autenticidad	iii
Aprobación de los Miembros de Tribunal de Grado.....	iii
Derechos de Autor	v
Dedicatoria.....	vi
Agradecimientos	vii
Índice General de Contenidos.....	viii
índice de Tablas.....	xi
Índice de Figuras y Gráficos	xiv
Resumen.. ..	xv
Abstract.....	XVI
Introducción	1
CAPÍTULO I.....	5
EL PROBLEMA.....	5
1.1. Tema de la investigación	5
1.2. Justificación	5
1.3. Objetivo	6
1.3.1. Objetivo general	6
1.3.2. Objetivos específicos.....	6
CAPÍTULO II.....	7
MARCO TEÓRICO	7

2.1.	Antecedentes investigativos	7
2.2.	Hipótesis.....	8
2.2.1.	Hipótesis Nula	8
2.2.2.	Hipótesis Alternativa	8
2.3.	Señalamiento de variables de la hipótesis	8
CAPÍTULO III.....		9
MATERIAL Y MÉTODOS.....		9
3.1.	Material.....	9
3.1.1.	Medios de cultivo	9
3.1.2.	Material y equipos	9
3.2.	Métodos.....	9
3.2.6.	Remoción de cadmio mediante el uso de levaduras	18
3.2.6.1.	Interferencias en la identificación de la capacidad de remoción.....	19
3.2.6.2.	Capacidad de remoción de cadmio por parte de las levaduras	19
3.2.6.3.	Supervivencia de las levaduras estudiadas en el experimento de remoción.	20
3.3.	Diseño Experimental	20
CAPÍTULO IV		21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		21
4.1.	Análisis y discusión de los resultados	21
4.1.1.	Determinación del número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml), mediante la curva McFarland.....	21
4.1.2.	Cuantificación de las levaduras mediante la curva McFarland	22
4.2.	Determinación del factor de crecimiento	28

4.3.	Inhibición de crecimiento de las levaduras frente a diferentes concentraciones de cadmio	29
4.4.	Análisis de la cadmio	32
4.4.1.	Curva estándar para la determinación de cadmio	32
4.5.	Comparación del método de la ditizona con el método de absorción atómica.....	33
4.6.	Remoción de cadmio mediante el uso de levaduras	34
4.6.1.	Interferencias en la capacidad de remoción	34
4.6.1.1.	Interferencia del medio YM.....	34
4.6.1.2.	Interferencia del proceso de centrifugación.....	35
4.6.1.3.	Interferencia de la biomasa de las levaduras	36
4.6.1.4.	Interferencia del proceso de filtración.....	36
4.6.2.	Capacidad de remoción de cadmio por parte de las levaduras	37
4.6.3.	Análisis de Varianza de los porcentajes de remoción de cadmio de las tres levaduras.....	42
4.6.4.	Supervivencia de las levaduras estudiadas en el experimento de remoción	45
4.6.5.	Cálculo de los ufc necesarias para remover un microgramo de cadmio.....	46
4.6.6.	Verificación de hipótesis	48
	CAPÍTULO V	49
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
5.1.	Conclusiones	49
5.2.	Recomendaciones.....	50
	Referencias Bibliográficas	51
	Anexos.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) y cloruro de bario (BaCl ₂), para la elaboración de la curva McFarland.	11
Tabla 2. Preparación de las diluciones de cadmio para la determinación de la inhibición del crecimiento de las levaduras estudiadas.....	14
Tabla 3. Volumen necesario para el análisis de cadmio por el método original (INEN 0982) y por el método modificado.....	15
Tabla 4. Concentración y preparación de los estándares para la curva de cadmio	18
Tabla 5. Valores de absorbancia del precipitado químico sulfato de bario (BaSO ₄).....	21
Tabla 6. Número de colonias calculadas y obtenidas de <i>R. mucilaginosa</i>	25
Tabla 7. Número de colonias calculadas y obtenidas de <i>C. gastricus</i>	26
Tabla 8. Número de colonias calculadas y obtenidas de <i>S. cerevisiae</i>	27
Tabla 9. Número de exponente de cada especie de levadura estudiada	28
Tabla 10. Factores de crecimiento real y proyectado de cada especie de levaduras estudiadas	29
Tabla 11. Inhibición de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> frente a concentraciones cadmio	30
Tabla 12. Inhibición de crecimiento de <i>C. gastricus</i> frente a concentraciones cadmio	31
Tabla 13. Inhibición de <i>S. cerevisiae</i> frente a concentraciones cadmio.....	31
Tabla 14. Datos de absorbancias de los estándares de cadmio realizados por el método de la ditizona	32

Tabla 15. Datos de concentración de cadmio por el método de la ditizona modificado y el método de absorción atómica,	33
Tabla 16. Datos de influencia del medio liquido YM en el valor de la concentración de cadmio	34
Tabla 17. Datos de interferencia de la centrifuga en la detección de la concentración de cadmio en estándares preparados en medio liquido YM.	35
Tabla 18. Datos de interferencia de la centrifuga en la detección de la concentración de cadmio en estándares preparados en agua destilada.	35
Tabla 19. Datos de interferencia de la biomasa en la detección de la concentración de cadmio	36
Tabla 20. Datos de interferencia del proceso de filtración en la detección de la concentración de cadmio con estándares preparados con medio liquido YM	36
Tabla 21. Datos de interferencia del proceso de filtración en la detección de la concentración de cadmio con estándares preparados agua destilada.....	37
Tabla 22. Concentración de cadmio ($\mu\text{g/l}$) presente en la solución durante el proceso de remoción en función del tiempo.....	38
Tabla 23. Porcentaje de remoción de cadmio a la concentración de 2140 $\mu\text{g/l}$ en función del tiempo.	41
Tabla 24. ANOVA para <i>R. mucilaginosa</i>	42
Tabla 25. ANOVA para <i>C. gastricus</i>	42
Tabla 26. ANOVA para <i>S. cerevisiae</i>	43
Tabla 27. Test de Tukey para <i>R. mucilaginosa</i>	44
Tabla 28. Test de Tukey para <i>C. gastricus</i>	45
Tabla 29. Porcentaje de supervivencia de <i>R. mucilaginosa</i> en el proceso de remoción de cadmio.....	46

Tabla 30. Porcentaje de supervivencia de <i>C. gastricus</i> en el proceso de remoción de cadmio.....	46
Tabla 31. Porcentaje de supervivencia de <i>S. cerevisiae</i> en el proceso de remoción de cadmio.....	46
Tabla 32. Cantidad de ufc necesarias para remover un μg de cadmio	48

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

Figura 1. Estructura química de la ditizona	3
Figura 2. Complejo Cadmio-ditizona.....	4
Figura 3. Diluciones seriadas para determinar el exponete de las levaduras estudiadas	12
Figura 4. Determinación del factor de crecimiento.....	13
Gráfico 1. Estimación lineal de la concentración de levaduras	22
Gráfico 2. Curva estándar para la determinación de cadmio	32
Gráfico 3. Capacidad de remoción por parte de las levaduras estudiadas con respecto al tiempo	39
Gráfico 4. Porcentaje de remoción de cadmio con levaduras en función del tiempo.....	40
Gráfico 5. Remoción de cadmio a partir de una solución de (2140 µg/l).....	41

RESUMEN

Se determinó la capacidad de remoción de cadmio por las levaduras *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus gastricus* y *Saccharomyces cerevisiae* mediante el método colorimétrico de la ditizona. La remoción por parte de las levaduras se estudió a pH 6 aproximadamente en un incubador orbital a una temperatura de 27 °C. A concentraciones de 34240 µg/l de cadmio, se determinó que los porcentajes de remoción fueron mayores al 95 %, evidenciando un alto índice de mortalidad de las levaduras durante el proceso de remoción.

Además se experimentó el proceso de eliminación de cadmio a concentraciones de 2140 µg/l, manteniendo las condiciones detalladas anteriormente, donde *R. mucilaginosa* mostró una capacidad de remoción del 100% del metal pesado mientras que *C. gastricus* y *S. cerevisiae* tuvieron una capacidad de remoción del 98,5 % y 99,5 % respectivamente.

Palabras clave: remoción de cadmio, análisis químico cuantitativo, levaduras aisladas, ditizona, volcán Tungurahua.

ABSTRACT

The removal capacity of cadmium by *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus gastricus* and *Saccharomyces cerevisiae* was determined by the colorimetric dithizone method. Cadmium removal by the yeasts was studied a pH of 6 and in an incubator orbital at a temperature of 27 ° C, and at concentrations of 34240 mg/l of cadmium, the removal rates were higher than 95 %, showing a high death rate of the yeasts in the removal process.

In addition, the process of removing cadmium was tested at concentrations of 2140 mg/l, maintaining the conditions described above. In this case *Rhodotorula mucilaginosa* showed a removal capacity of 100 % of heavy metal while *C. gastricus* and *S. cerevisiae* had a maximum capacity of 98,5 % and 99,5 % respectively.

Keywords: removal of cadmium, quantitative chemical analysis, isolated yeasts, dithizone, Tungurahua volcano.

INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados es una de las formas de contaminación más peligrosas al medio ambiente, ya que no presenta ningún tipo posible de degradación química o biológica (**Azza y Nabila S., 2013**) y además, tiende a bioacumularse.

Los efectos tóxicos de los metales pesados no se detectan fácilmente a corto plazo, aunque si puede haber una incidencia muy importante a mediano y largo plazo (**Fariba y Farzad, 2014**). Entre los efectos tóxicos de los metales pesados se encuentran el retraso en el desarrollo, varios tipos de cáncer, daños en el riñón e incluso, la muerte (**Ade et al., 2010**).

En los últimos años se ha observado que algunos cultivos agrícolas presentan altas concentraciones de metales pesados entre estos: cadmio (Cd) y níquel (Ni), donde la calidad de los alimentos puede estar amenazada (**Esam y Mohamed, 2010**).

El cadmio es un elemento del grupo II-B de la tabla periódica, su número atómico es 48 y su ion monoatómico más estable es el Cd^{2+} . En la naturaleza se lo encuentra asociado al cinc, cobre y plomo, siendo los compuestos más comunes el CdO, el $CdCl_2$ y el $Cd(OH)_2$ (**Tálos et al., 2012**).

Mite et al. (2010), establecieron que en Ecuador la contaminación de cadmio proviene principalmente de dos fuentes, una de ellas es natural (erupciones volcánicas) mientras que la otra fuente es causada por el hombre, por las explotaciones de minas, uso indiscriminado de agroquímicos, empleo de lodos urbanos en la agricultura, gases provenientes de las industrias entre otros.

Existen varios métodos para la eliminación de metales pesados en soluciones acuosas entre los que se incluyen, adsorción sobre carbón activado, ósmosis inversa, intercambio iónico, precipitación química, y filtración por membrana. Sin embargo, la viabilidad de los factores económicos y técnicos podría limitar la aplicación de estos métodos (**Azza y Nabila S., 2013**).

La bioadsorción de metales pesados por biomasa viva o muerta es una nueva tecnología y una forma rentable para la eliminación de metales pesados de soluciones acuosas (**Kalyani, et al., 2012**). Los microorganismos tienen la capacidad de atrapar iones de metales pesados, debido a la presencia de grupos funcionales con diferentes cargas(hidroxilos, sulfhidrilos, aminas, amidas, grupos imidazol, carboxilos, fosfatos, y tioesteres, entre otros) en su pared celular (**Esam H. y Mohamed, 2010**). Esta capacidad de bioadsorción dependerá de la cantidad de sitios activos presentes en cada microorganismo. Además la capacidad de bioadsorción depende de varios factores fisicoquímicos como el pH de la solución, la fuerza iónica, la temperatura, el tipo de ión metálico y sobre todo de su concentración.

El valor del pH de la solución es un factor de gran importancia debido a que cuando se requiere la absorción de cationes metálicos, por ejemplo el Cadmio (Cd), se ha determinado que aumenta la bioadsorción al aumentar el valor del pH.(**Umesh et al., 2010**). Los valores extremos de pH, pueden dañar la estructura del material bioadsorbente, por ejemplo células deformadas y pérdida de peso, esto significa disminución en la capacidad de adsorción.

El proceso de bioadsorción se ve afectado por la presencia de otros iones metálicos en la solución, ya que pueden competir con los metales de interés por los sitios de bioadsorción (**Fariba y Farzad, 2012**)

La capacidad de bioadsorción depende de la concentración de microorganismos utilizados en el proceso, por lo tanto las concentraciones microbianas se pueden determinar mediante el recuento en placa y mediante el método de McFarland.

La técnica McFarland se fundamenta en la medición de bacterias en suspensión con base a estándares que imitan ópticamente suspensiones bacterianas y que son obtenidos por precipitación química. Estos se obtienen mezclando volúmenes definidos de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y cloruro de bario ($BaCl_2$), resultando sulfato de bario ($BaSO_4$) en suspensión.

Existen varios métodos analíticos para determinar Cadmio, tales como HPLC, espectrometría de llama de absorción atómica (FAAS) entre otros, pero estos métodos, tienen la desventaja de que son relativamente costosos, por esta razón se busca alternativas para la determinación de la concentración de este metal (**Ganotes et al, 2010**). Una de estas alternativas es el método de la ditizona, donde el cadmio bajo condiciones apropiadas reacciona con la ditizona (difeniltiocarbazona), con la formación de un complejo coloreado (rosado a rojo).

La estructura química de la ditizona se muestra en la figura 1, y el complejo que forma con el cadmio en la figura 2.

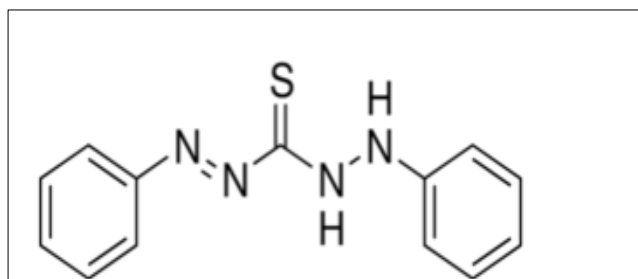


Figura 1. Estructura química de la ditizona

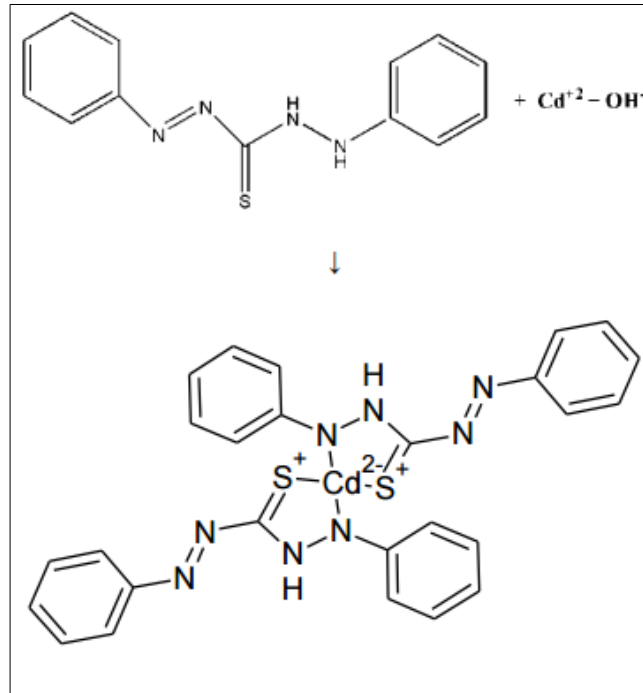


Figura 2. Complejo Cadmio-ditizona

CAPÍTULO I EL PROBLEMA

1.1. Tema de la investigación

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE CADMIO MEDIANTE LEVADURAS (*Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus gastricus*), AISLADAS DEL VOLCÁN TUNGURAHUA.

1.2. Justificación

El cadmio necesita una atención especial, ya que se identifica como un contaminante significativo debido a su alta solubilidad y toxicidad en el agua y sobre todo por sus efectos en el ambiente, por tal razón en las últimas décadas se ha estudiado la eliminación de metales pesados mediante sistemas biológicos, entre estos destaca la bioacumulación natural de cadmio en las poblaciones microbianas como las bacterias y las algas, convirtiéndose en una nueva tecnología de biorremediación, por procesos de biosorción por remoción biológica; reduciendo eficazmente la concentración de iones metálicos de este tipo **(Singanan, 2011)**.

El uso de microorganismos para la remoción de metales pesados ofrece una alternativa potencial a los métodos existentes, por su eficacia los microorganismos utilizan diversas estrategias de supervivencia para combatir el estrés al cadmio, que incluyen el secuestro de iones metálicos, expulsión activa de metales; algunos usan desintoxicación enzimática y acumulación de cadmio **(Syed et al., 2014)**.

Según **Tálos et al. (2012)** las levaduras de tipo *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) pueden llegar a un equilibrio de adsorción de iones metálicos dentro de los sesenta minutos al trabajar con bajas concentraciones.

Sinha y Samir (2009) estudiaron la eliminación biológica de cadmio por *Pseudomonas aeruginosa* (KUCD1), los resultados mostraron que esta especie es un buen candidato para la eliminación de cadmio y tiene la capacidad de eliminar el 75 y 89 por ciento de este metal.

De acuerdo al estudio presentado por **Hidalgo (2015)** del aislamiento de doce levaduras procedentes del volcán Tungurahua, se identificaron diez especies diferentes destacándose las especies *Cryptococcus sp.* Y *Rhodotorula mucilaginosa* (*R. mucilaginosa*). Estudios posteriores evaluaron la supervivencia y tolerancia de las levaduras en presencia de diferentes metales, entre ellos cadmio (**Moreta, 2016**).

1.3. Objetivo

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de remoción de cadmio mediante levaduras (*R. mucilaginosa* y *C. gastricus*), aisladas del volcán Tungurahua

1.3.2. Objetivos específicos

1. Elaborar la curva McFarland para determinar la cantidad de Ufc/ml
2. Elaborar una curva para determinar la concentración de cadmio por el método de la ditizona.
3. Determinar la remoción máxima de cadmio por las levaduras.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

La bioadsorción es una técnica innovadora dirigida a la eliminación de metales pesados de aguas contaminadas, mediante el uso de biomasa. La adherencia de los metales pesados a la levadura se debe a interacciones físico-químicas con grupos activos presentes en la membrana celular (carboxílicos, grupos fosfato, sulfato, amino, amida e hidroxilo) **(Vegliò et al., 2010)**.

Estudios previos de las propiedades de tolerancia de las levaduras frente a metales pesados proporcionan una información valiosa sobre su papel ecológico y adaptaciones al crecimiento en condiciones tan extremas **(Singh et al., 2013)**. **Salinas et al. (2000)** estudiaron la eliminación de cadmio (Cd) por la levadura *Rhodotorula rubra* a una concentración de 5-40 mg/l, donde se estudió la influencia del pH y la temperatura de la solución en la eliminación de metales pesados. La bioadsorción de Cd se vio afectada significativamente por el pH inicial de la solución, siendo el pH óptimo de 5,5-6, mientras que la temperatura influyó directamente en la absorción de Cd.

Otros estudios realizados con levaduras de la especie *Cryptococcus sp.*; aisladas de alta mar, **(Singh et al., 2013)** sugieren a esta especie como un candidato potencial para la biorremediación de sitios contaminados con metales, donde se obtuvo una bioadsorción de cadmio del 30 % al 90 % después de 4 días de crecimiento a 30 °C, cabe recalcar que la cuantificación del metal pesado se lo realizó mediante absorción atómica (AAS).

Tálos et al. (2012) documentaron que la levadura *S. cerevisiae* es un biomaterial eficaz para la eliminación de metales pesados, para la cual la bioadsorción más alta fue de 110 mg de Cd por cada 0,30 g L⁻¹ de levadura.

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis Nula

¿Las levaduras *R. mucilaginosa* y *C. gastricus* tienen capacidad de remover cadmio de soluciones acuosas?

2.2.2. Hipótesis Alternativa

¿Las levaduras *R. mucilaginosa* y *C. gastricus* no tienen capacidad de remover cadmio de soluciones acuosas?

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis

Variable independiente

- Especie de levadura: *R. mucilaginosa* y *C. gastricus* aisladas del volcán Tungurahua.
- Concentraciones de cadmio ($\mu\text{g/l}$)

Variable dependiente

- Remoción de cadmio (%)
- Tiempo de remoción (horas)

CAPÍTULO III MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Medios de cultivo

PDA (Agar papa dextrosa) (NEOGEN[®] Corporation), Medio líquido YM preparado con D-Glucosa Anhidra granular (Mallinckrodt Chemicals, USA); Bacto[™] Extracto de Levadura Extracto de Malta y Peptona (Becton Dickinson and Company, USA)

3.1.2. Material y equipos

Balones de aforo de 25 ml (PYREX ± 0.04 ml), balones de aforo de 200 ml (PYREX ± 0.10 ml), bureta de 25ml, resolución 1ml (GLASSCO ± 0.05 ml), Micropipetas (CORNING), Vortex Mix (FISHER SCIENTIFIC), Balanza Analítica (OHASUS, Modelo PA214), Espectrofotómetro UV-visible (EVOLUTION 201), Autoclave (ALLAMERICAN), Incubadora (INCUCCELL), Incubadora con agitación (IVYMEN SYSTEM), Cabina de seguridad biológica - Class II, Type A2 (Labconco, USA)

3.2. Métodos

Se experimentó la capacidad de remoción de cadmio en soluciones acuosas de levaduras *R. mucilaginoso* y *C. gastricus*, aisladas del volcán Tungurahua de acuerdo estudios presentados por **Hidalgo (2015)** y **Moreta (2016)**

Además se incrementó el estudio de la capacidad de remoción por parte *S. cerevisiae*, por ser un eficiente agente eliminador de metales pesados como se manifestó en la sección 2.1. En el anexo A se presenta las características macroscópicas de mismas.

3.2.1. Curva McFarland

3.2.1.1. Activación y conservación de las levaduras estudiadas

Del inóculo congelado a -20 °C de cada una de las tres especies se realizó un repique mediante estría compuesta en cajas Petri que contenían medio agar papa dextrosa (PDA) y que fueron incubadas a 27 °C por 72 horas. Posteriormente se realizó un raspado de la caja Petri para obtener biomasa, que se colocó en un tubo de vidrio que contenía 10 ml de glicerol al 20% (p/v) y se homogenizó con un vortex. Finalmente las muestras fueron almacenadas a -10°C hasta su análisis.

3.2.1.2. Determinación del número de unidades formadoras de colonias (ufc), mediante la curva McFarland

El número de unidades formadoras de colonias (ufc), se determinó mediante la curva McFarland. Este método consiste en una relación entre la absorbancia de una suspensión de sulfato de bario y la absorbancia de una suspensión de levaduras. Para la realización de esta curva se utilizó una suspensión de sulfato de bario (BaSO₄), obtenida a partir de la mezcla de volúmenes conocidos de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y de solución de cloruro de bario (BaCl₂) (Tabla 1) **(Lahuerta Zamora et al., 2012)**. De cada concentración de sulfato de bario obtenida se midió la absorbancia a 600 nm y se obtuvo la recta patrón.

Tabla 1

Volúmenes de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y cloruro de bario (BaCl₂), para la elaboración de la curva McFarland.

Escala de McFarland	BaCl ₂ (0,048 M)	H ₂ SO ₄ (0,184 M)	Volumen final (ml)	Concentración BaSO ₄ en el volumen final (M)	Unidades McFarland
1	0,1	9,9	10	0,00048	3 x10 ^x
2	0,2	9,8	10	0,00096	6 x10 ^x
3	0,3	9,7	10	0,00144	9 x10 ^x
4	0,4	9,6	10	0,00192	12 x10 ^x
5	0,5	9,5	10	0,00240	15 x10 ^x
6	0,6	9,4	10	0,00288	18 x10 ^x
7	0,7	9,3	10	0,00336	21 x10 ^x
8	0,8	9,2	10	0,00384	24 x10 ^x
9	0,9	9,1	10	0,00432	27 x10 ^x
10	1	9	10	0,00480	30 x10 ^x

3.2.1.3. Cuantificación de las levaduras mediante la curva McFarland

Se raspó la biomasa de cada levadura estudiada, se la colocó en un tubo de vidrio estéril que contenía 10 ml de medio líquido YM y se midió la absorbancia a 600 nm, utilizando medio líquido YM como blanco. A partir de este valor de absorbancia se calculó la concentración inicial de levaduras mediante la ecuación de la curva McFarland. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁸ y se sembró 1 ml de las diluciones 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ en cajas Petri que contenían PDA para determinar el exponente de la concentración de cada una de las levaduras estudiadas.

En la figura 3 se observa el diagrama para determinar el exponente de la concentración de cada una de las levaduras estudiadas, realizándose este procedimiento por triplicado para así comprobar el número de ufc/ml obtenidos por la ecuación de la curva McFarland.

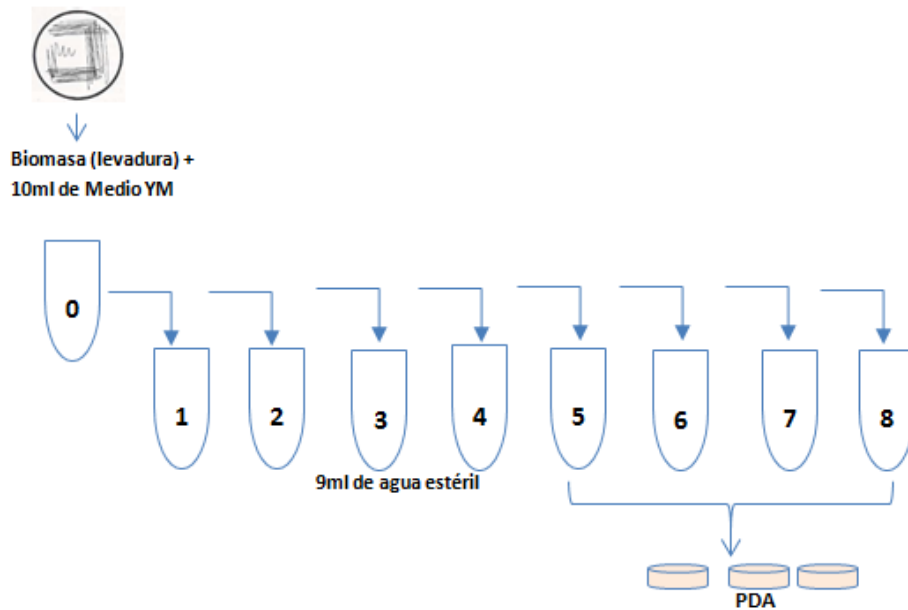


Figura 3. Diluciones seriadas para determinar el exponete de las levaduras estudiadas

3.2.2. Determinación del factor de crecimiento

Para obtener la biomasa y determinar las ufc/ml se procedió de igual manera que en el numeral 3.2.1.3.

Para determinar el factor de crecimiento se inoculó 1 ml de una dilución de 200 ufc/ml de cada levadura en 9 ml de medio YM, además se utilizó medio YM líquido como testigo. Posteriormente se midieron las absorbancias iniciales y finales después de 72 horas de incubación a 27 °C. El factor de crecimiento se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Factor Crecimiento} = \frac{\text{Conc. final}}{\text{Conc. inicial}} \quad \text{EC.1}$$

Las concentraciones iniciales y finales se calcularon a partir de la absorbancia obtenida e interpolando en la curva McFarland. Se realizaron diluciones seriadas y se inoculo 1 ml de la dilución respectiva de acuerdo al

número del exponente y su posterior comprobación por recuento en placa (Figura 4).

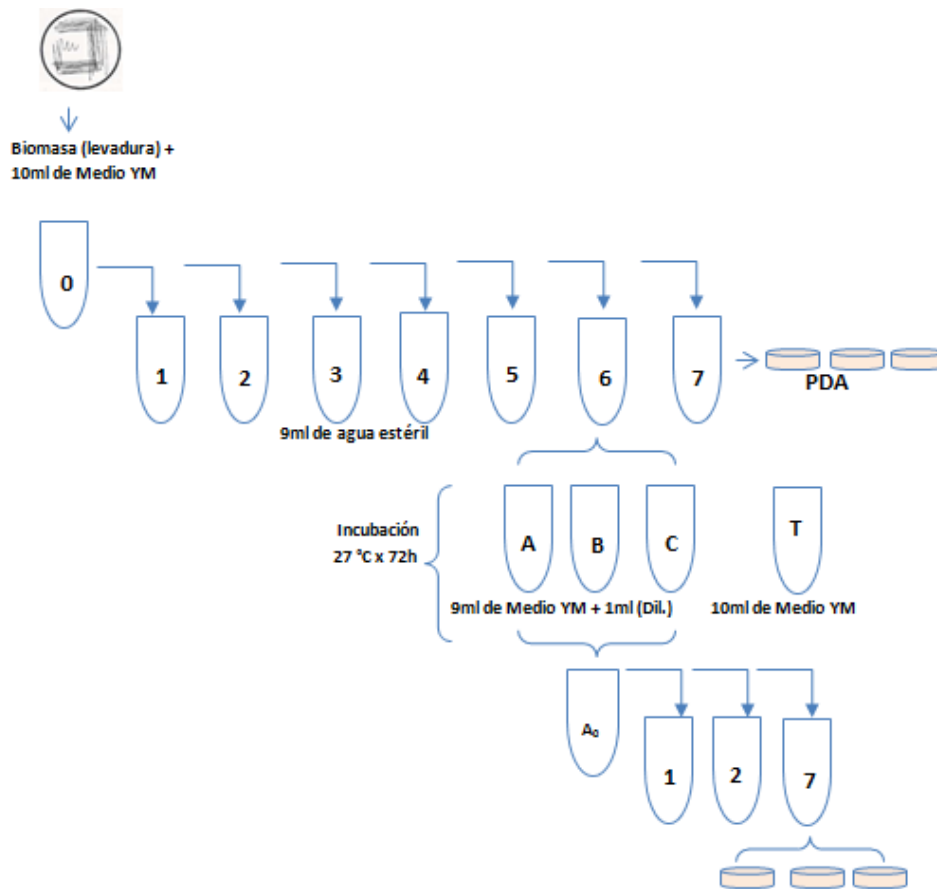


Figura 4. Determinación del factor de crecimiento

3.2.3. Inhibición de crecimiento de las levaduras frente a diferentes concentraciones de cadmio

Se determinó la inhibición del crecimiento de las levaduras frente a diferentes concentraciones de cadmio, basándose en una solución madre de cloruro de cadmio de 2140 $\mu\text{g/ml}$, pesándose 0,0872 g de (CdCl_2) y aforando a 25 ml con medio líquido YM. A partir de esta solución madre se realizaron diluciones desde 107 a 1,07 $\mu\text{g/ml}$, como se detalla en la tabla 2.

A continuación se preparó para cada una de las levaduras una serie de nueve soluciones, colocando en cada tubo 8 ml de medio líquido YM, 1 ml de levadura y 1 ml de la dilución de cadmio correspondiente (Tabla 2).

Tabla 2

Preparación de las diluciones de cadmio para la determinación de la inhibición del crecimiento de las levaduras estudiadas

Alícuota de Sol. madre (ml)	Medio YM (ml)	Volumen total (ml)	Cd (µg/ml)
0,50	9,500	10	107,00
0,40	9,600	10	85,60
0,30	9,700	10	64,20
0,20	9,800	10	42,80
0,10	9,900	10	21,40
0,05	9,950	10	10,70
0,03	9,970	10	6,42
0,01	9,990	10	2,14
0,005	9,995	10	1,07

Se utilizaron dos controles, uno de ellos contenía 1 ml de inóculo de levadura en medio líquido YM y otro contenía 1 ml de la dilución de cadmio correspondiente en medio líquido YM.

3.2.4. Análisis del cadmio

La concentración de cadmio se determinó por el método colorimétrico de la ditizona siguiendo la metodología detallada en la Norma Técnica Ecuatoriana (1984) INEN 0982 (Anexo B), modificada por el volumen de muestra requerido para determinar la capacidad de remoción de cadmio por parte de las levaduras (Tabla 3)

Tabla 3

Volumen necesario para el análisis de cadmio por el método original (INEN 0982) y por el método modificado

Requerimientos	Volumen (ml)		Factor de disminución
	Método INEN 0982 Original	Método INEN 0982 Modificado	
Volumen de muestra	200	2	100
Solución de tartrato de sodio y potasio	1,00	0,100	10
Solución I (NaOH-KCN)	5,00	0,500	10
Solución de clorhidrato de hidroxilamina	1,25	0,125	10
Solución de ditizona	30,00	3,000	10
Solución de ácido tartárico	25,00	2,500	10
Cloroformo (CHCl ₃)	15,00	1,500	10
Solución de clorhidrato de hidroxilamina	0,25	0,025	10
Solución II (NaOH-KCN)	5,00	0,500	10

3.2.4.1. Determinación de la concentración de cadmio por el método de la ditizona (INEN 0982 Modificado)

Preparación de soluciones:

Solución de tartrato de sodio y potasio: Se disolvieron 25 g de tartrato de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆.4H₂O) en agua destilada y se aforó a 100 ml

Soluciones de hidróxido de sodio-cianuro de potasio:

Solución I: Se disolvieron 40 g de NaOH y 1 g KCN en agua destilada y se aforó a 100 ml.

Solución II: Se disolvieron 40 g de NaOH y 0,05 g KCN en agua destilada y se aforó a 100 ml.

Solución de clorhidrato de hidroxilamina: Se disolvieron 20 g de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ en agua destilada y se aforó a 100 ml.

Solución de ditizona: Se disolvieron 0,01 g de difeniltiocarbazona (ditizona) en 100 ml de cloroformo (CHCl_3). Se guardó la solución en un frasco oscuro.

Solución de ácido tartárico: Se disolvieron 2 g de ácido tartárico ($\text{H}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) en agua destilada y se aforó a 100 ml. Esta solución se guardó en refrigeración, ya que debe usarse fría.

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

Solución indicadora de azul de timol: Se disolvieron 0,4 g de timol sulfonaftalina de sodio (azul de timol) en agua destilada y se aforó a 100 ml.

Tratamiento de las muestras:

Se colocaron 2 ml de la muestra problema en un tubo de ensayo y se agregaron 5 μl de HCl y 20 μl de azul de timol. Además se adicionaron de 8-10 μl de NaOH 6N hasta el cambio de color a amarillo del indicador (pH aproximado de 2,8). Se añadieron 500 μl de agua destilada, se homogenizó la solución con ayuda del vortex. En seguida se trasvasó el contenido del tubo de ensayo a un embudo de separación pequeño (embudo1). A este embudo secuencialmente se le adicionaron 100 μl de solución de tartrato de sodio y potasio, 500 μl de la solución I de NaOH-KCN, 100 μl de solución de clorhidrato de hidroxilamina y 1500 μl de solución de ditizona. Se tapó el embudo de separación y se agitó por 1 minuto. Después de haber agitado vigorosamente se dejó eluir la capa de cloroformo (CHCl_3) en un segundo embudo de separación que contenía 2500 μl de solución de ácido tartárico frío.

Al primer embudo de separación se agregaron 1000 μl de CHCl_3 y se agitó por 1 minuto y nuevamente se dejó eluir la capa orgánica en el segundo embudo de separación, evitándose que la capa acuosa entrara en el segundo embudo, esto se lo realizó en un intervalo de tiempo de aproximadamente un minuto para evitar que el tiempo de contacto entre el cloroformo y la solución alcalina fuera muy prolongado y como consecuencia se descomponga el complejo ditizona-cadmio

Rápidamente se agitó el segundo embudo por 2 minutos y se descartó la capa de cloroformo, luego se añadieron 500 μl de CHCl_3 al embudo, en seguida se agitó por 1 min y se descartó la capa de CHCl_3 , permitiendo que la separación sea lo más definida posible.

Al residuo en el embudo, se adicionaron 25 μl de clorhidrato de hidroxilamina, 1500 μl de solución de ditizona y 500 μl de la solución II de NaOH-KCN e inmediatamente se agitó por 1 minuto, luego de haber realizado la agitación se insertó un tapón de algodón en el vástago del embudo de separación y luego se filtró la capa orgánica en un tubo limpio y seco. Se leyeron la absorbancias a 518 nm utilizando el blanco como referencia, al cual se realizó el mismo tratamiento, cambiando la muestra problema por agua.

3.2.4.2. Curva estándar para la determinación de cadmio

Se realizó una curva estándar de 0 a 428 $\mu\text{g/l}$ de cadmio en el equipo de UV-visible siguiendo la metodología detallada en el numeral 3.2.4.1.

Esta curva se la realizó basándose en una solución madre de cloruro de cadmio (CdCl_2) de 53503 μg de cadmio por litro, pesándose 0,0872 g y aforando a 1000 ml con agua destilada.

En la tabla 4 se indica la preparación de los estándares de cadmio utilizados en la realización de la curva.

Tabla 4

Concentración y preparación de los estándares para la curva de cadmio

Estándares de CdCl ₂	Concentración µg/l	Relación de solución madre/agua destilada
1	107	50µl Sol. Madre/25ml agua destilada
2	214	100µl Sol. Madre/25ml agua destilada
3	321	150µl Sol. Madre/25ml agua destilada
4	428	200µl Sol. Madre/25ml agua destilada

3.2.5. Comparación del método de la ditizona y el método de absorción Atómica

Se comparó el método de la ditizona con el método de absorción atómica en el análisis de cadmio. Para esto se enviaron muestras a un laboratorio acreditado de la ciudad de Quito (ALS Corplab) para el análisis de la concentración de cadmio presente en la solución por absorción atómica.

3.2.6. Remoción de cadmio mediante el uso de levaduras

La capacidad de remoción de cadmio por *R. mucilaginosa*, *C. gastricus* y *S. cerevisiae*, se evaluó a través de la capacidad de bioadsorción de éstas, en donde se aprovecha la adherencia del metal pesado a los sitios activos de las levaduras para la eliminación de cadmio.

3.2.6.1. Interferencias en la identificación de la capacidad de remoción

Se estudió la influencia del medio líquido YM, la interferencia del proceso de centrifugación y filtración, además la interferencia de la biomasa en la cuantificación de la concentración de cadmio, para la cual se prepararon estándares de cadmio de 107 µg/l mediante el procedimiento detallado en el apartado 3.2.4.2. Se trabajó por triplicado con dos tipos de estándares uno de ellos preparado con agua destilada y otro con medio líquido YM.

Para determinar la influencia del medio líquido YM se tomaron 2 ml de cada uno de los estándares anteriormente mencionados y se cuantificaron por el método de la ditizona para comparar sus concentraciones.

De cada estándar se tomaron dos alícuotas de 5 ml cada una y se colocaron en tubos de centrifugación, centrifugándose uno de los tubos a 4000 rpm por un lapso de tiempo de 10 min y el otro a 2500 rpm por un mismo intervalo tiempo. Una vez finalizado el proceso de centrifugación se tomaron 2 ml de cada tubo para cuantificar la concentración de cadmio por el método de la ditizona.

Al momento de determinar la interferencia de la filtración se utilizó papel filtro de tipo cualitativo, en donde se tomaron 5 ml de cada uno de los dos tipos de estándares detallados anteriormente y se dejó filtrar por gravedad, una vez observado que el proceso de filtración se había completado en su totalidad, se tomaron 2ml para cuantificar la concentración de cadmio por el método de la ditizona.

3.2.6.2. Capacidad de remoción de cadmio por parte de las levaduras

Para asegurar la confiabilidad de las lecturas de concentración de cadmio por el método de la ditizona se utilizó como control de calidad estándares de 214 µg de cadmio por litro en cada una de las réplicas.

A partir de una solución de alrededor de 34240 µg cadmio por litro se tomaron 4 ml y se colocaron en un recipiente de vidrio que contenía 32 ml de agua destilada y 4 ml de inóculo de levadura de acuerdo a lo señalado en las tablas 25, 26 y 27 de cada levadura respectivamente.

Se midió el valor de pH de la solución contenida en el recipiente de vidrio y se colocó en una incubadora con agitación a 130 rpm y a una temperatura de 27 °C durante 24 horas.

También se utilizó un recipiente de vidrio que contenía 36 ml de agua destilada y 4 ml de la solución de cadmio de 34240 µg cadmio por litro como testigo.

Como control se utilizó un recipiente de vidrio que contenía 36 ml de agua destilada y 4 ml del inóculo de cada levadura.

3.2.6.3. Supervivencia de las levaduras estudiadas en el experimento de remoción.

Para la determinación de la supervivencia de las levaduras se tomó una alícuota de 1 ml de la solución que contenía 32 ml de agua destilada, 4 ml de inóculo de levadura y 4 ml de la solución de cadmio descrita anteriormente, se realizaron diluciones seriadas y se realizó la siembra mediante el método de difusión en placa de agar PDA (27 °C por 72 horas). Las siembras se realizaron al inicio y al final del proceso de remoción

3.3. Diseño Experimental

La remoción de cadmio se realizó por triplicado con dos levaduras: (*R. mucilaginosa*, *C. gastricus*) aisladas del volcán Tungurahua y una levadura de referencia (*S. cerevisiae*). Se aplicó un diseño completo al azar, el cual se analizó estadísticamente a través de un análisis de varianza y pruebas estadísticas de Tukey.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de los resultados

4.1.1. Determinación del número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml), mediante la curva McFarland

De acuerdo a la metodología detallada en el numeral 3.2.1.2, se midieron las absorbancias a 600 nm (Tabla 5).

Tabla 5

Valores de absorbancia del precipitado químico sulfato de bario (BaSO₄)

	ESTANDAR	*CONC. Ufc/ml (10 ⁶ / 10 ⁷)	ABS (600nm)
REPLICA 1	0	0	0,0549
	1	3	0,3496
	2	6	0,6103
	3	9	0,8663
	4	12	1,0944
	5	15	1,3494
	6	18	1,4985
	7	21	1,6812
REPLICA 2	0	0	0,1115
	1	3	0,3692
	2	6	0,5773
	3	9	0,8008
	4	12	1,1418
	5	15	1,3255
	6	18	1,4902
	7	21	1,7303
REPLICA 3	0	0	0,0865
	1	3	0,3327
	2	6	0,6108
	3	9	0,8929
	4	12	1,1175
	5	15	1,3808
	6	18	1,5859
	7	21	1,7369

* Para *R. mucilaginosa* y *S. cerevisiae* el exponente de concentración fue 10⁷, mientras que para *C. gastricus* fue 10⁶

El gráfico 1 muestra las curvas McFarland obtenidas para la estimación lineal de la concentración de levaduras y los límites de absorbancia superior e inferior de la ecuación de la recta obtenida a partir de los datos de absorbancia del precipitado químico (sulfato de bario). Esta ecuación permitió determinar posteriormente la concentración en ufc/ml de las levaduras estudiadas.

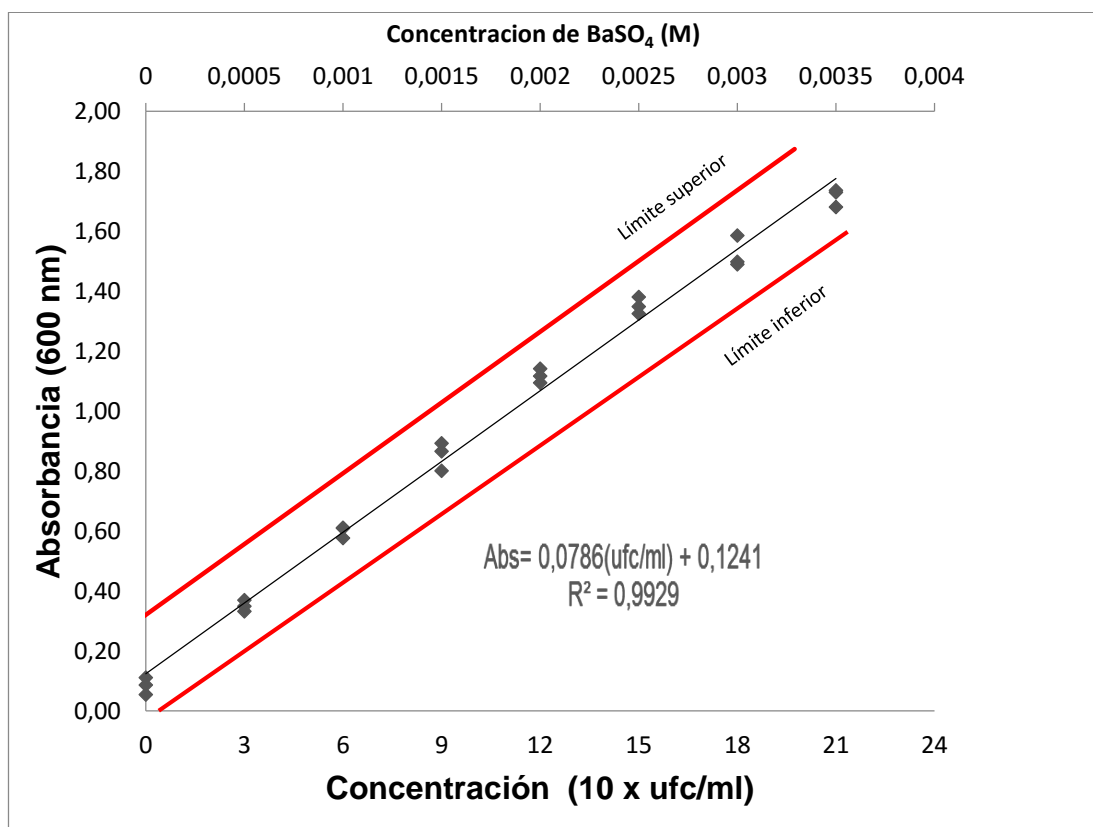


Gráfico 1. Estimación lineal de la concentración de levaduras

A partir de la curva McFarland obtenida se determinaron los límites superior e inferior de detección en absorbancia y en cuantificación de concentración en ufc/ml, representado en el anexo C.

4.1.2. Cuantificación de las levaduras mediante la curva McFarland

Con la ecuación de la curva McFarland detallada anteriormente se obtuvieron las unidades formadoras de colonia por mililitro de cada levadura, mediante la simulación con la suspensión de sulfato de bario, mientras que

mediante difusión en placa de agar PDA se determinó el exponente de la concentración de cada una de las levaduras estudiadas (Tablas 6,7,8).

A continuación se detalla un ejemplo de los cálculos realizados en *R. mucilaginosa* de la dilución 7 en la réplica 1:

Media aritmética (\bar{x})

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

Dónde:

\bar{x} = Media aritmética

$\sum_{i=1}^n xi$ = Sumatoria de todos los datos

n = Número total de la muestra

$$\bar{x} = \frac{20 + 22 + 21}{3}$$

$$\bar{x} = 21$$

Desviación estándar (s)

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

Dónde:

\bar{x} = Media aritmética

xi = Cada uno de los datos

n = Número total de la muestra

$$s = \sqrt{\frac{(20 - 21)^2 + (22 - 21)^2 + (21 - 21)^2}{3 - 1}}$$

$$s = 1,00$$

Porcentaje de Recuperación (%R)

$$\%R = \frac{\bar{x}}{\text{ufc/ml}} * 100 \quad \text{EC. 4}$$

Dónde:

\bar{x} = Media aritmética

ufc/ml = Calculadas en la curva McFarland

n=Número total de la muestra

$$\%R = \frac{21}{25} * 100$$

$$\%R = 82,4$$

Porcentaje del Coeficiente de Variación (%CV)

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

$$\%CV = \frac{1,00}{21} * 100$$

$$\%CV = 4,76$$

Tabla 6*Número de colonias calculadas y obtenidas de R. mucilaginosa*

		Número de colonias calculadas en la curva McFarland	Número de colonias obtenidas			Media	Desv. Estándar	% Recuperación	% Coef. Variación
			1	2	3				
REPLICA 1	Dil 5	2550	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
	Dil 6	255	248	250	254	251	3,06	98,30	1,22
	Dil 7	25	20	22	21	21	1,00	82,40	4,76
	Dil 8	2	0	0	0	0	0	0	0
REPLICA 2	Dil 5	2049	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
	Dil 6	204	203	200	204	202	2,08	98,75	1,03
	Dil 7	20	19	21	20	20	1,00	97,56	5
	Dil 8	2	0	0	0	0	0	0	0
REPLICA 3	Dil 5	2059	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
	Dil 6	204	190	198	203	197	6,56	96,14	3,33
	Dil 7	20	21	20	18	20	1,53	95,47	7,77
	Dil 8	2	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 7*Número de colonias calculadas y obtenidas de C. gastricus*

		Número de colonias calculadas en la curva McFarland	Número de colonias obtenidas			Media	Desv. Estándar	% Recuperación	% Coef. Variación
			1	2	3				
REPLICA 1	Dil 4	2848	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
	Dil 5	284	259	260	260	259,67	0,58	91,18	0,22
	Dil 6	28	28	26	26	26,67	1,15	93,57	4,33
	Dil 7	2	0	0	0	0	0	0	0
REPLICA 2	Dil 4	2466	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
	Dil 5	246	240	242	240	240,67	1,15	97,55	0,48
	Dil 6	24	24	25	24	24,33	0,58	98,52	2,37
	Dil 7	2	0	0	0	0	0	0	0
REPLICA 3	Dil 4	2319	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
	Dil 5	231	240	239	242	240,33	1,53	103,64	0,64
	Dil 6	23	24	24	26	24,67	1,15	106,32	4,68
	Dil 7	2	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 8*Número de colonias calculadas y obtenidas de S. cerevisiae*

		Número de colonias calculadas en la curva McFarland	Número de colonias obtenidas			Media	Desv. Estándar	% Recuperación	% Coef. Variación
			1	2	3				
REPLICA 1	Dil 5	2742	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
	Dil 6	274	269	274	268	270	3,21	98,55	1,19
	Dil 7	27	23	27	24	25	2,08	90,02	8,44
	Dil 8	2	0	0	0	0	0	0	0
REPLICA 2	Dil 5	2521	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
	Dil 6	252	249	253	246	249	3,51	98,86	1,41
	Dil 7	25	23	24	24	24	0,58	93,92	2,44
	Dil 8	2	0	0	0	0	0	0	0
REPLICA 3	Dil 5	2727	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
	Dil 6	272	268	263	301	277	20,65	101,66	7,45
	Dil 7	27	27	30	26	28	2,08	101,34	7,52
	Dil 8	2	0	0	0	0	0	0	0

Mediante los porcentajes de recuperación obtenidos se señala la funcionalidad de la curva McFarland, ya que para *C. gastricus* y *S. cerevisiae* los porcentajes de recuperación fueron mayores al 90 % en todas sus réplicas, mientras que para *R. mucilaginosa* se obtuvo un porcentaje de recuperación en las réplicas que fue desde 82,40-97,56 % en la dilución 7, y de 96,14-98,75 % en la dilución 6.

Para la determinación del exponente de la cantidad de ufc se realizó la siembra en placa de agar PDA de cada una de las levaduras estudiadas. Los exponentes hallados para cada levadura se muestran en la tabla 9.

Tabla 9.

Número de exponente de cada especie de levadura estudiada

Especie de levadura	Exponente
<i>R. mucilaginosa</i>	7
<i>C. gastricus</i>	6
<i>S. cerevisiae</i>	7

4.2. Determinación del factor de crecimiento

La disponibilidad de los nutrientes esenciales, tales como azúcares, aminoácidos y compuestos nitrogenados, influyen en las tasas de crecimiento de las células de las levaduras. Por tal razón se estudió los factores de crecimiento de las levaduras estudiadas como se muestran en la tabla 10. Además, en esta tabla se muestran los rangos de crecimientos proyectados y reales de cada levadura.

Tabla 10

Factores de crecimiento real y proyectado de cada especie de levaduras estudiadas

Levaduras Estudiadas	Factor de crecimiento Proyectado	Factor de crecimiento real	Rango de crecimiento Proyectado		Rango de crecimiento real	
			Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
<i>R. mucilaginosa</i>	1,38E+06	1,44E+06	0,327E+06	2,93E+06	0,398E+06	2,72E+06
<i>C. gastricus</i>	9,13E+06	8,34E+06	7,03E+06	12,6E+06	6,50E+06	10,0E+06
<i>S. cerevisiae</i>	4,74E+06	4,03E+06	3,08E+06	6,69E+06	2,00E+06	5,19E+06

4.3. Inhibición de crecimiento de las levaduras frente a diferentes concentraciones de cadmio

Todas las concentraciones de cadmio estudiadas produjeron una inhibición del 100% en el crecimiento de *C. gastricus* y *R. mucilaginosa* (Tablas 11 y 12). Por el contrario, en el caso de *S. cerevisiae* su crecimiento sólo fue inhibido a partir de 107 µg de cadmio por mililitro (Tabla 13). Esta inhibición podría estar asociada a la inactivación de proteínas, dado por la combinación del metal pesado con los grupos sulfhidrilos de las proteínas y enzimas de las levaduras (Inchaustegui, 2007).

A continuación se detalla un ejemplo de los cálculos realizados en *S. cerevisiae* de la determinación de porcentaje de inhibición del crecimiento a una concentración de cadmio de 85,6 (µg/ml).

Porcentaje de crecimiento

$$\% \text{Crecimiento} = \frac{\# \text{ de Ufc/ml Finales}}{\text{Crecimiento esperado}} * 100 \quad \text{EC. 6}$$

$$\% \text{Crecimiento} = \frac{2,73 \times 10^7}{83,82 \times 10^7} * 100$$

$$\% \text{Crecimiento} = 3,26$$

Porcentaje inhibición

$$\% \text{Inhibición} = (100 - \% \text{Crecimiento}) * 100 \quad \text{EC. 7}$$

$$\% \text{Inhibición} = (100 - 3,26) * 100$$

$$\% \text{Inhibición} = 96,74$$

Tabla 11

Inhibición de crecimiento de R. mucilaginosa frente a concentraciones cadmio

N° tubo	Conc Cd (µg/ml)	ufc/ml Inoculados	Crecimiento esperado E +07	Abs. 600 nm		ufc/ml (Finales) E +07	% C*	% Inh*
				Inicial	Final (72h a 27°C)			
1	42,8	156	22,46	0,029	0,014		0,000	100
2	21,4	156	22,46	0,031	0,018	No existe crecimiento	0,000	100
3	10,7	156	22,46	0,031	0,081		0,000	100
4	6,42	156	22,46	0,029	0,099		0,000	100
5	2,14	156	22,46	0,025	0,130		0,000	100
6	1,07	156	22,46	0,026	0,152	0,062	0,003	99,997

C* = crecimiento, Inh* = Inhibición

Tabla 12*Inhibición de crecimiento de C. gastricus frente a concentraciones cadmio*

N° tubo	Cd (µg/ml)	ufc/ml inoculados	Crecimiento esperado E +06	Abs. 600 nm		ufc/ml (finales) E +06	% C*	% Inh*
				Inicial	Final (72 h a 27 °C)			
1	42,8	82	68,34	0,029	0,056			
2	21,4	82	68,34	0,031	0,048			
3	10,7	82	68,34	0,042	0,042	No existe crecimiento	0	100
4	6,42	82	68,34	0,043	0,043			
5	2,14	82	68,34	0,041	0,041			
6	1,07	82	68,34	0,038	0,038			

C* = crecimiento, Inh* = Inhibición

Tabla 13*Inhibición de S. cerevisiae frente a concentraciones cadmio*

N° tubo	Conc cd (µg/ml)	ufc/ml Inoculados	Crecimiento esperado E +07	Abs. 600 nm		ufc/ml (finales) E +07	% C*	% Inh*
				Inicial	Final (72h a 27°C)			
1	107	208	84,4	0,036	0,047	No existe crecimiento	0	0
2	85,6	208	84,4	0,035	0,339	2,73	3,23	96,77
3	64,2	208	84,4	0,036	0,463	4,31	5,10	94,90
4	42,8	208	84,4	0,032	0,505	4,85	5,74	94,26
5	21,4	208	84,4	0,03	0,544	5,34	6,32	93,68
6	10,7	208	84,4	0,03	0,84	9,11	10,79	89,21

C* = crecimiento, Inh* = Inhibición

En el caso de *R. mucilaginosa* existe una leve disminución en el porcentaje de inhibición a una concentración de cadmio de 1,07 (µg/ml) como se muestra en la (Tabla 11).

4.4. Análisis de la cadmio

4.4.1. Curva estándar para la determinación de cadmio

En la tabla 14 se muestran los datos de absorbancia de los estándares de cadmio siguiendo la metodología detallada en el numeral 3.2.4.2.

Tabla 14

Datos de absorbancias de los estándares de cadmio realizados por el método de la ditizona

Concentración de Cd (µg/l)	Abs. 518 nm		
	Replica 1	Replica 2	Replica 3
0	0,009	0,006	0,005
107	0,2348	0,303	0,256
214	0,6315	0,58	0,642
321	0,988	0,991	0,895
428	1,2656	1,317	1,289

Al graficar los datos de absorbancia obtenidos de los estándares mencionados anteriormente se obtuvo un coeficiente de correlación al cuadrado (R^2) de 0,9929 como se puede apreciar en el Gráfico 2.

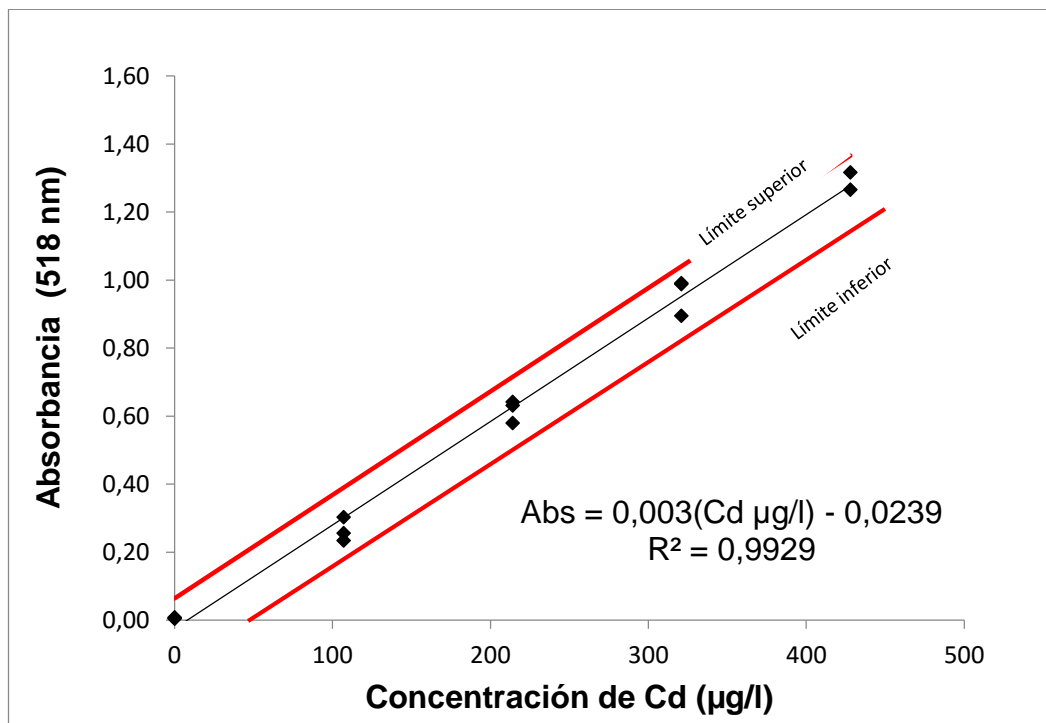


Gráfico 2. Curva estándar para la determinación de cadmio

A partir de la curva de calibración para la cuantificación de cadmio se determinó el límite superior e inferior de detección en absorbancia y en cuantificación de concentración de cadmio (Anexo C).

4.5. Comparación del método de la ditizona con el método de absorción atómica

Se estableció una comparación entre el método de la ditizona modificado y el método de absorción atómica, como se muestra en la tabla 15, para lo cual se tomaron dos alícuotas, una de ellas se analizó por el método de la ditizona antes y después de la digestión y la otra por absorción atómica.

Tabla 15

Datos de concentración de cadmio por el método de la ditizona modificado y el método de absorción atómica

	Antes de la digestión	Después de la digestión	Absorción atómica
Estándar (214 µg/l)	175,00	183,00	170,00
	183,00	175,00	150,00
	170,00	174,00	300,00
	172,00	170,00	250,00
	173,00	169,00	150,00
	171,00	167,00	180,00
Solución de Cd (34240 µg/l)	162,00	158,00	200,00
	157,00	161,00	150,00
	146,00	162,00	120,00
	164,00	172,00	130,00
	169,00	174,00	110,00
Muestras del proceso de remoción de Cd con levaduras	111,00	144,00	320,00
	69,00	98,00	550,00
	62,00	107,00	250,00
	56,00	56,00	600,00
	91,00	76,00	90,00

A estos resultados se aplicó una prueba t Student de dos muestras emparejadas para comparar los resultados de concentraciones de cadmio.

Donde los valores de t calculados son menores a los valores de t críticos, por lo tanto se infiere que no existe diferencia significativa entre los valores de cadmio reportados por el método de la ditizona y los valores de cadmio reportados por el método de absorción atómica (Anexo D).

4.6. Remoción de cadmio mediante el uso de levaduras

Primero se determinaron las posibles interferencias que podían influir en la lectura de concentración de cadmio, por el método de la ditizona modificado.

4.6.1. Interferencias en la capacidad de remoción

4.6.1.1. Interferencia del medio YM

Se compararon las concentraciones de los estándares de 107 µg/l, preparados con agua destilada y preparados con medio líquido YM respectivamente, observándose que existe un aumento en la concentración final del estándar de 107 µg/l preparado con medio líquido YM, mientras la concentración final del estándar de 107 µg/l preparado con agua destilada se mantiene, como se muestra en la tabla 16. Este aumento podría deberse a la interacción del cadmio con los componentes de medio líquido YM causando una interferencia en exceso.

Tabla 16

Datos de influencia del medio líquido YM en el valor de la concentración de cadmio

Replicas	Blanco	Estándar 107µg/l (Preparado con medio YM)		Estándar 107µg/l (Preparado con agua destilada)	
		Absorbancia 518 nm	Concentración µg/l	Absorbancia 518 nm	Concentración µg/l
1	0	0,465	162,97	0,278	100,63
2	0	0,440	154,63	0,303	108,97
3	0	0,485	169,63	0,286	103,30

4.6.1.2. Interferencia del proceso de centrifugación

Al estudiar la interferencia provocada por el proceso de centrifugación se determinó un descenso en la concentración del estándar de 107 µg/l preparado con medio líquido YM (Tabla 17), lo que podría deberse a la interacción del metal pesado con el medio líquido YM y por el efecto de la fuerza centrífuga, en cambio en los estándares preparados con agua destilada no se determinó un descenso en la concentración del estándar (Tabla 18).

Tabla 17

Datos de interferencia de la centrifuga en la detección de la concentración de cadmio en estándares preparados en medio líquido YM

Replicas	Blanco	Estándar 107µg/l		Estándar 107µg/l (Centrifugado 4000 rpm* 10min)		Estándar 107µg/l (Centrifugado 2500 rpm* 10min)	
		Abs. 518 nm	Concentración µg/l	Abs. 518 nm	Concentración µg/l	Abs. 518 nm	Concentración µg/l
1	0	0,465	162,97	-0,139	0	-0,016	0
2	0	0,440	154,63	-0,175	0	-0,277	0
3	0	0,485	169,63	-0,104	0	-0,133	0

Tabla 18

Datos de interferencia de la centrifuga en la detección de la concentración de cadmio en estándares preparados en agua destilada

Replicas	Blanco	Estándar 107µg/l		Estándar 107µg/l (Centrifugado 4000 rpm* 10min)		Estándar 107µg/l (Centrifugado 2500 rpm* 10min)	
		Abs. 518 nm	Concentración µg/l	Abs. 518 nm	Concentración µg/l	Abs. 518 nm	Concentración µg/l
1	0	0,283	105,3	0,279	103,97	0,28	104,30
2	0	0,295	109,3	0,282	104,97	0,299	110,63
3	0	0,290	107,6	0,269	100,63	0,289	107,30

4.6.1.3. Interferencia de la biomasa de las levaduras

No se encontró ninguna interferencia de la biomasa de las levaduras estudiadas en la detección de la concentración del estándar de 107 µg/l preparado con medio líquido YM (Tabla 19).

Tabla 19

Datos de interferencia de la biomasa en la detección de la concentración de cadmio

Replicas	Blanco	Estándar 107µg/l (Preparado con medio YM)		Estándar 107µg/l (Preparado con medio YM) + biomasa de levadura	
		Abs. 518nm	Concentración µg/l	Abs. 518nm	Concentración µg/l
1	0	0,465	162,97	0,465	162,97
2	0	0,44	154,63	0,485	169,63
3	0	0,485	169,63	0,48	167,97

4.6.1.4. Interferencia del proceso de filtración

En la determinación de los valores de concentraciones de los estándares de 107 µg/l, preparados con agua destilada y medio YM respectivamente se observó que el proceso de filtración interfiere en la concentración del estándar (Tablas 20 y 21).

Tabla 20

Datos de interferencia del proceso de filtración en la detección de la concentración de cadmio con estándares preparados con medio líquido YM

Replicas	Blanco	Std. 107µg/l (Preparado con medio YM)		Std. 107µg/l (Preparado con medio YM) (filtrado en papel filtro cualitativo)	
		Abs. 518 nm	Concentración µg/l	Abs. 518 nm	Concentración µg/l
1	0	0,465	162,97	-0,589	0
2	0	0,44	154,63	-0,62	0
3	0	0,485	169,63	-0,58	0

Tabla 21

Datos de interferencia del proceso de filtración en la detección de la concentración de cadmio con estándares preparados agua destilada.

Replicas	Blanco	Std. 107µg/l (Preparado con agua destilada)		Std. 107µg/l (Preparado con agua destilada) (filtrado en papel filtro cualitativo)	
		Abs. 518 nm	Concentración µg/l	Abs. 518 nm	Concentración µg/l
1	0	0,287	106,6	0,175	69,3
2	0	0,290	107,6	0,183	72,0
3	0	0,288	107,0	0,179	70,6

Disminución en las concentraciones de los estándares de 107 µg/l, podrían deberse a la interacción del medio líquido YM y el metal pesado formándose una molécula más grande en comparación con el medio poroso del papel filtro cualitativo utilizado.

4.6.2. Capacidad de remoción de cadmio por parte de las levaduras

Para evaluar la capacidad de remoción de cadmio por parte de *R. mucilaginosa*, *C. gastricus* y *S. cerevisiae* se realizó una prueba preliminar para determinar la eliminación del metal pesado con respecto al tiempo, utilizando una concentración de cadmio de 34240 (µg/l) (Tabla 22). Para el análisis se utilizó un estándar de 214 µg de cadmio por litro como control de calidad que fue leído antes de cada ensayo del proceso de remoción, considerando el 25% del valor esperado ($\pm 53,5$ µg/l).

Tabla 22

Concentración de cadmio ($\mu\text{g/l}$) presente en la solución durante el proceso de remoción en función del tiempo

Especie de levadura	Tiempo (h)					
	0	0,16	3	6	9	24
<i>R. mucilaginosa</i>		4713,1	1433,93	1140,83	1154,17	2107,92
<i>C. gastricus</i>	34938,89*	6148,33	1057,03	848,03	565,07	629,07
<i>S. cerevisiae</i>		3058,37	859,67	469,67	401,2	450,53

*Valor de la concentración de cadmio presente en la solución determinado experimentalmente.

Se determinó que para *R. mucilaginosa*, a partir de las tres horas del proceso de remoción, no existe eliminación de cadmio, mientras que para *C. gastricus* y *S. cerevisiae* se estableció que alcanza una eliminación del metal hasta las nueve horas del proceso de remoción. Después de este tiempo ya no se observan cambios significativos en la concentración de cadmio existente en la solución, esto podría deberse a que se crea un equilibrio entre el cadmio presente en la solución y el cadmio absorbido por la levadura (**Umesh et al., 2010**).

En el gráfico 3 se evidencia que después de los tiempos mencionados cada una de las levaduras estudiadas alcanzan una remoción de tipo asintótica. Además se pudo determinar que a las veinticuatro horas de remoción existió un aumento en la concentración de cadmio en la solución, en comparación con concentraciones de horas anteriores (Tabla 22).

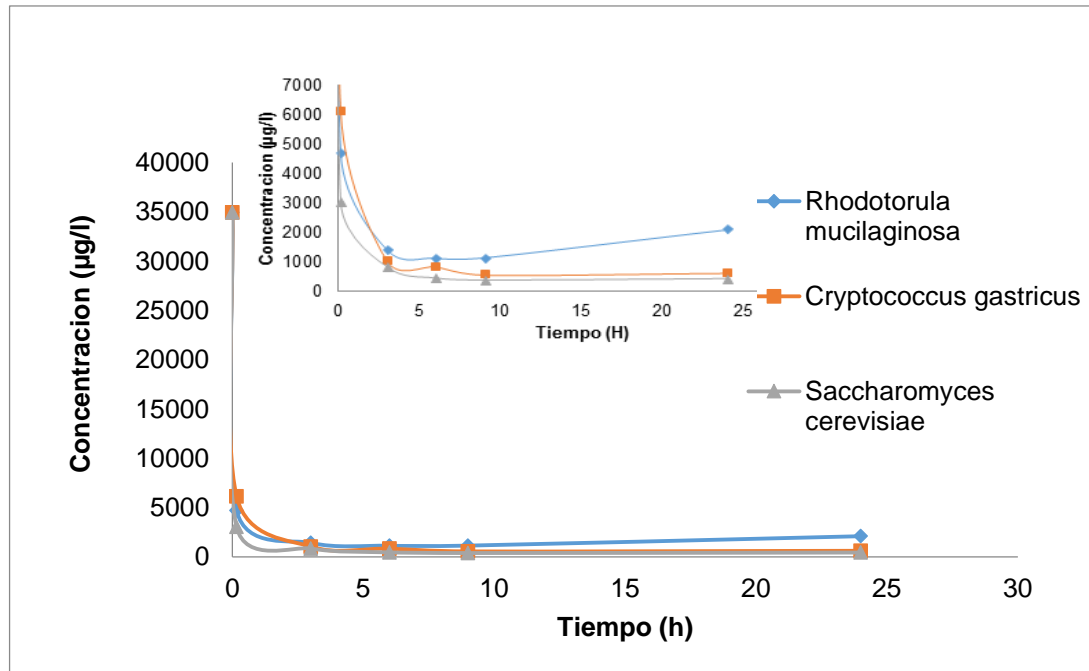


Gráfico 3. Capacidad de remoción por parte de las levaduras estudiadas con respecto al tiempo

A partir de los datos obtenidos de la capacidad de remoción de cadmio mediante las pruebas preliminares mencionadas en la tabla 23 para *R. mucilaginosa* se midió la concentración de cadmio presente en la solución cada hora hasta un tiempo máximo de remoción de tres horas (0,16, 1, 2, 3) h, sin embargo para *C. gastricus* y *S. cerevisiae* la capacidad de eliminación de este metal pesado se midió cada tres horas con un tiempo máximo de remoción de nueve horas (0,16, 3, 6, 9) h.

Los porcentajes de remoción se muestran en el gráfico 4, observándose que existe una disminución del 91,7 % en la concentración de cadmio en la solución a las 0,16 horas para *R. mucilaginosa* y un 95,6 % al final del proceso. Para la especie *C. gastricus*, a las 0,16 horas existe una disminución del 79 % en la concentración de cadmio y al final del proceso (9 horas) un 96,9 %.

Al experimentar con la cepa de *S. cerevisiae* se establece una disminución del 88,9 % en la concentración de cadmio a las 0,16 horas, mientras que a las nueve horas del proceso logra una remoción del 95,1 % del metal pesado.

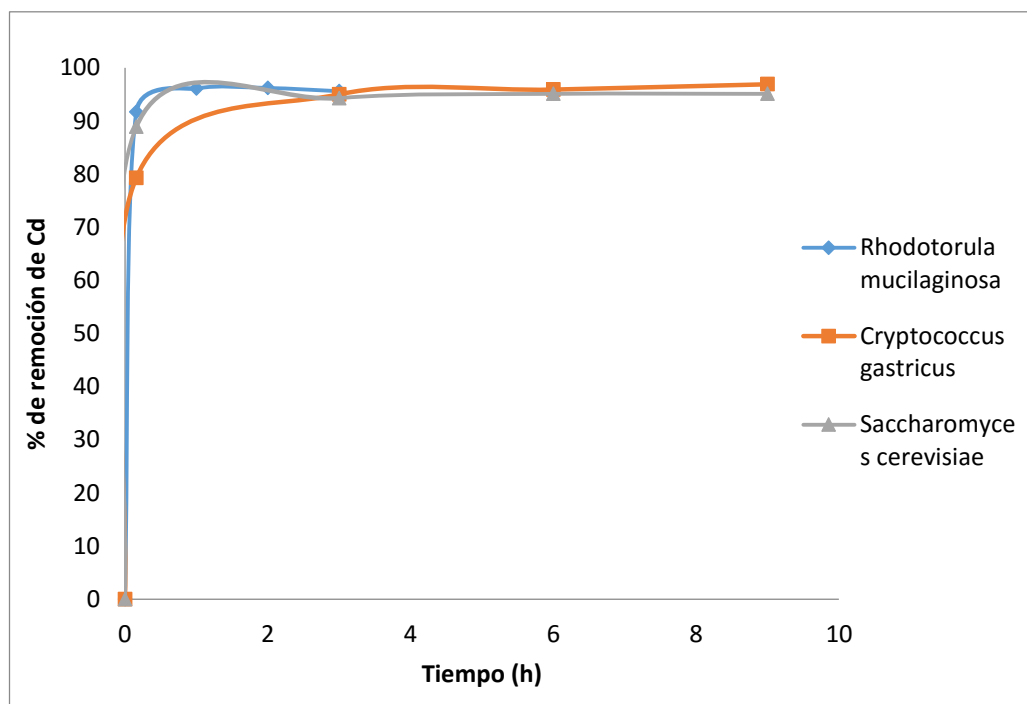


Gráfico 4. Porcentaje de remoción de cadmio con levaduras en función del tiempo

Evidenciando la efectividad de la remoción de cadmio en concentraciones alrededor de 34240 $\mu\text{g/l}$, se realizó un ensayo a una concentración de 2140 $\mu\text{g/l}$ para comprobar si la remoción funciona de manera similar. Los resultados de este experimento se evidencian en el gráfico 5.

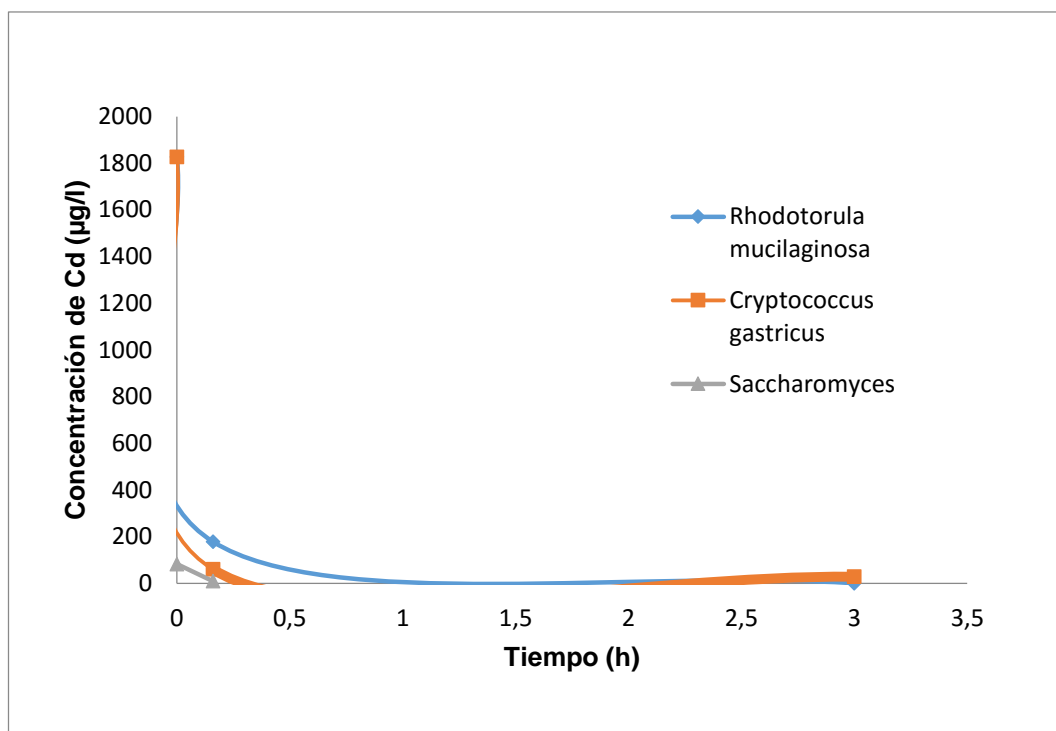


Gráfico 5. Remoción de cadmio a partir de una solución de (2140 µg/l).

La capacidad de remoción a la concentración de 2140 µg/l no se ve afectada, evidenciándose en el caso de *R. mucilaginosa* un 100% de remoción de cadmio de la solución, mientras que las especies *C. gastricus* y *S. cerevisiae* alcanzan un porcentaje de remoción del 98,5 % y 99,5 % respectivamente, como se evidencia en la tabla 23.

Tabla 23

Porcentaje de remoción de cadmio a la concentración de 2140 µg/l en función del tiempo.

Especie	Tiempo (h)	
	0,16	3
<i>R. mucilaginosa</i>	90,3	100
<i>C. gastricus</i>	96,8	98,5
<i>S. cerevisiae</i>	95,5	99,5

Al analizar todo los datos obtenidos del proceso de remoción, se puede considerar que el proceso de remoción es inmediato y existe un descenso

considerable en la concentración de cadmio, en un tiempo de contacto entre el metal pesado y la biomasa de levadura, lo cual concuerda con lo que establece (Tejada *et al.*, 2014) que la bioadsorción son procesos rápidos y eficientes en la eliminación de metales pesados.

4.6.3. Análisis de Varianza de los porcentajes de remoción de cadmio de las tres levaduras

Se aplicó el análisis de varianza de un factor con un nivel de significancia de 0,05 (Tablas 24, 25 y 26) para comparar los datos de remoción de cadmio entre horas de las tres levaduras.

Tabla 24

ANOVA para R. mucilaginosa

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	42,353333	3	14,1177778	12,320969	0,0022837	4,0661805
Dentro de los grupos	9,1666666	8	1,14583333	7		5
Total	51,52	11				

Tabla 25

ANOVA para C. gastricus

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	628,1291	3	209,376389	10,18037	0,00417103	4,066180
Dentro de los grupos	164,5333	8	20,5666667			
Total	792,6625	11				

Tabla 26ANOVA para *S. cerevisiae*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	80,3025	3	26,7675	2,7664283 9	0,11107268	4,0661805 5
Dentro de los grupos	77,406666	8	9,67583333			
Total	157,70916	11				

En el caso de *R. mucilaginosa* y *C. gastricus* los valores de F calculados son mayores que los valores de F críticos, por lo tanto existe diferencia significativa entre los tiempos estudiados con respecto a los porcentajes de remoción, por lo que se evaluó por el test estadístico de Tukey.

En el análisis de varianza de la especie *S. cerevisiae* se observa que no existe diferencia significativa entre los tiempos estudiados respecto al porcentaje de remoción.

A continuación se presenta el cálculo demostrativo de Tukey para *R. mucilaginosa*

n: Número de elementos del grupo

$$n = 8$$

Multiplicador: Valores de la Tabla de Tukey

$$\text{Multiplicador} = 4,04$$

Ms: Cuadrado del error medio

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

$$M_s = \frac{9,166}{8}$$

$$M_s = 1,14$$

HSD: Diferencia honestamente significativa

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

$$HSD = 4,04 * \sqrt{\frac{1,14}{3}}$$

$$HSD = 2,49$$

Tabla 27

Test de Tukey para R. mucilaginosa

HSD= 2,49

Tiempo (Horas)	0,16	1	2	3
0,16				
1	4,4 *			
2	4,5 *	0,1		
3	3,9 *	-0,5	-0,6	

* Los valores son mayores a la diferencia honestamente significativa (HSD)

0,16 horas es diferente a 1, 2, 3 horas y que 1, 2 y 3 horas son similares. Por lo tanto en el caso de *R. mucilaginosa* el tiempo de contacto requerido es suficiente con 1 hora.

Tabla 28

Test de Tukey para C. gastricus

HSD= 10,57

<i>Tiempo (Horas)</i>	0,16	3	6	9
0,16				
3	15,7 *			
6	16,6 *	0,9		
9	17,6 *	1,9	1	

* Los valores son mayores a la diferencia honestamente significativa (HSD)

0,16 horas es diferente a 3, 6, 9 horas y que 3, 6 y 9 horas son similares. Por lo tanto en el caso de *C. gastricus* el tiempo de contacto requerido es suficiente con 3 horas

4.6.4. Supervivencia de las levaduras estudiadas en el experimento de remoción

Los porcentajes de supervivencia de las levaduras estudiadas en el proceso de remoción son menores al 1%, esto se da a una concentración de 34240 µg de cadmio por litro (Tablas 29, 30 y 31).

El proceso de remoción del metal pesado no se ve afectado por el alto índice de mortalidad de las levaduras y esto se lo puede comparar con lo que establece **Tejada et al. (2014)** que el proceso de bioadsorción no se ve detenido por la muerte de la biomasa debido a las altas concentraciones de los metales pesados.

Tabla 29

Porcentaje de supervivencia de *R. mucilaginosa* en el proceso de remoción de cadmio

Tiempo (h)	ufc colocados	Número de colinas esperadas (Dil 5)	Promedio de colonias contadas (Dil 5)	% Supervivencia	% Mortalidad
0	61,2 E+07	6100	38 ± 3	0,6	99,4
3	61,2 E+07	6100	11 ± 1	0,2	99,8

Tabla 30

Porcentaje de supervivencia de *C. gastricus* en el proceso de remoción de cadmio.

Tiempo (h)	ufc colocados	Número de colinas esperadas (Dil 4)	Promedio de colonias contadas (Dil 4)	% supervivencia	% Mortalidad
0	62,68 E+06	6200	10 ± 1	0,16	99,84
3	62,68 E+06	6200	8 ± 1	0,12	99,88

Tabla 31

Porcentaje de supervivencia de S. cerevisiae en el proceso de remoción de cadmio

Tiempo (h)	ufc colocados	Número de colinas esperadas (Dil 5)	Promedio de colonias contadas (Dil 5)	% supervivencia	% Mortalidad
0	60,68 E+07	6000	10 ± 2	0,16	99,84
3	60,68 E+07	6000	7 ± 1	0,12	99,88

4.6.5. Cálculo de los ufc necesarias para remover un microgramo de cadmio

De las levaduras estudiadas se calculó el número de ufc necesarias para remover cada microgramo de cadmio presente en la solución.

A continuación se detalla un ejemplo de los cálculos realizados en *R. mucilaginosa* para determinar las ufc necesarias por cada microgramo de cadmio.

$$30383,33 \mu\text{g Cd} \rightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$X \rightarrow 40 \text{ ml}$$

$$X = 1215,33 \mu\text{g Cd}$$

$$60,63 \times 10^7 \text{ ufc} \rightarrow 100\%$$

$$X \rightarrow 99,4$$

$$X = 60,26 \times 10^7 \text{ ufc}$$

$$60,26 \times 10^7 \text{ ufc} \rightarrow 1215,33 \mu\text{g Cd}$$

$$X \rightarrow 1 \mu\text{g Cd}$$

$$X = 4,95 \times 10^5 \frac{\text{ufc}}{\mu\text{g Cd}} \pm 1\%$$

Como se puede observar en la tabla 32 en el caso de *R. mucilaginosa* se requiere $4,95 \times 10^5 \pm 1\%$ ufc por cada microgramo de cadmio presente en la solución, mientras que para *C. gastricus* se necesita $4,96 \times 10^4 \pm 1\%$ ufc y para *S. cerevisiae* se requiere $4,96 \times 10^5 \pm 1\%$ ufc por cada microgramo de cadmio. El 1% se debe a los datos de supervivencias de las levaduras estudiadas frente a soluciones de cadmio.

Tabla 32

Cantidad de ufc necesarias para remover un μg de cadmio

Especie	Supervivencia (%)	ufc / μg Cd
<i>R. mucilaginosa</i>	0,20	$4,95 \times 10^5 \pm 1\%$
<i>C. gastricus</i>	0,12	$4,96 \times 10^4 \pm 1\%$
<i>S. cerevisiae</i>	0,12	$4,96 \times 10^5 \pm 1\%$

4.6.6. Verificación de hipótesis

Hipótesis Nula

¿Las levaduras *R. mucilaginosa* y *C. gastricus*), tienen capacidad de remover cadmio de soluciones acuosas?

Hipótesis Alternativa

¿Las levaduras *R. mucilaginosa* y *C. gastricus* no tienen capacidad de remover cadmio de soluciones acuosas?

Después de analizar y discutir los resultados de remoción de cadmio por las levaduras estudiadas, se acepta la interrogante de la hipótesis nula. Por lo tanto *R. mucilaginosa* y *C. gastricus* si poseen la capacidad de remover cadmio e igual que *S. cerevisiae*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Mediante el uso de levaduras, tales como *R. mucilaginosa* y *C. gastricus* aisladas del volcán Tungurahua, se alcanza de un 95% partiendo de una concentración de 34240 µg/l del metal pesado, mientras que a una concentración de 2140 µg/l la eliminación del cadmio es del 100% en el caso de *R. mucilaginosa*.

En el caso de *S. cerevisiae* se pudo comprobar que igual que *R. mucilaginosa* y *C. gastricus* es un agente eficaz en la eliminación de cadmio.

Se elaboró la curva McFarland para determinar la cantidad de ufc/ml con un porcentaje de recuperación del 90% para *C. gastricus* y *S. cerevisiae* en todas sus diluciones, mientras que para *R. mucilaginosa* se obtiene un porcentaje de recuperación mayor del 95%, excepto en una réplica. Por lo tanto la curva McFarland funciona en la determinación de la concentración de levaduras.

Se comparó estadísticamente los resultados del análisis de cadmio entre el método de la ditizona modificado y el método de absorción atómica, donde se pudo demostrar que el método de la ditizona modificado arroja datos similares y comparables con el método absorción atómica. Además en el método de la ditizona modificado de la Norma INEN 0982 se optimiza el volumen de muestra para el análisis en 100 veces menos a la norma INEN 0982 original.

Se determinó la cantidad de ufc necesarios en el proceso de remoción por cada microgramo de cadmio en el caso de *R. mucilaginosa* se requiere $4,95 \times 10^5 \pm 1\%$, mientras que para *C. gastricus* se necesita $4,96 \times 10^4 \pm 1\%$ y para *S. cerevisiae* se requiere $4,96 \times 10^5 \pm 1\%$.

5.2. Recomendaciones

Ampliar el estudio de la capacidad de remoción de cadmio por parte de *R. mucilaginosa* en muestras de aguas provenientes de la industria.

Evaluar los pH's y las temperaturas óptimas para repotenciar las capacidades de remoción de cadmio en *C. gastricus* y *S. cerevisiae*.

Referencias Bibliográficas

- Adle, D., Sinani, D., & Kim, H. (2010). A Cadmium-transporting P1B-type ATPase in Yeast *S. cerevisiae**. *The Journal of Biological Chemistry*, 282.
- Azza, M., & Nabila S., A. (2013). Biosorption of cadmium and lead from aqueous solution by fresh water alga *Anabaena sphaerica* biomass. *Journal of Advanced Research*, 4, 367–374.
- Esam H., A., & Mohamed, H. (2010). Removal Efficiency of the Heavy Metals Zn(II), Pb(II) and Cd(II) by *Saprolegnia delica* and *Trichoderma viride* at Different pH Values and Temperature Degrees. *Mycobiology*, 135–144.
- Fariba, M., & Farzad, S. (2012). Biological removing of Cadmium from contaminated media by fungal biomass of *Trichoderma* species. *Journal Environ Health Science*, 102.
- Fariba , M., & Farzad , S. (2014). Biological removing of Cadmium from contaminated media by fungal biomass of *Trichoderma* species. *J Environ Health Science Engineering*, 102.
- Ganotes, J., Larson , E., & Navone, R. (2010). Suggested Dithizone Method for Cadmium Determination. *American Water Works Association*, 852-854.
- Hidalgo, K. (2015). Primer estudio sobre la diversidad de levaduras asociadas a un volcán: Tungurahua, Ecuador (Ingeniera Bioquímica), Universidad Tecnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Inchaustegui, S. (2007). Microbiología Química. Control de microorganismos Química Clínica
- Kalyani, S., Rao, P., & Krishnaiah, A. (2012). Eliminación de metales a partir de soluciones acuosas utilizando maroalgae marina como la biomasa de sorción. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12-13.
- Lahuerta Zamora, L., Pérez, M., & Gracia, T. (2012). Using digital photography to implement the McFarland method. *J R Society Interface*.

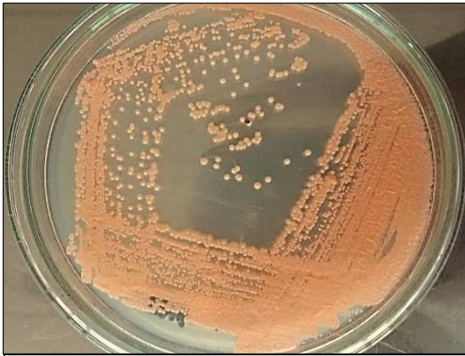
- Mite, F., Carrillo, M., & Durango, W. (2010). *AVANCES DEL MONITOREO DE PRESENCIA DE CADMIO EN ALMENDRAS DE*. Paper presented at the XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo, Santo Domingo.
- Moreta , M. F. (2016). Análisis de la resistencia a estrés por metales pesados de levaduras aisladas del volcán Tungurahua, Ecuador. Ambato.
- Salinas, E., Elorza de Orellano, M., Rezza, I., Martinez, L., & Marchesvkyc, E. (2000). Removal of cadmium and lead from dilute aqueous solutions by *Rhodotorula rubra*. *Bioresource Technology*, 107–112.
- Singanan, M. (2011). Removal of lead(II) and cadmium(II) ions from. *Research Article*, 115-119.
- Singh , P., Raghukumar , C., Parvatkar , R., & Mascarenhas-Pereira , M. (2013). Heavy metal tolerance in the psychrotolerant *Cryptococcus* sp. isolated from deep-sea sediments of the Central Indian Basin. *NCBI Education*, 93-101.
- Sinha , S., & Samir , K. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* KUCD1, a possible candidate for cadmium bioremediation. *Braz J Microbiol*, 655–662.
- Syed , a., Mohd , R., Norli , I., & Japareng, L. (2014). Isolation, Identification, and Characterization of Cadmium Resistant *Pseudomonas* sp. M3 from Industrial Wastewater. *Journal of Waste Management*, 1-6.
- Tálos , K., Pernyeszi, T., Majdik, C., & Páger, C. (2012). Cadmium biosorption by baker's yeast in aqueous suspension. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 1-3.
- Tejada, C., Villabona-Ortiz, Á., & Garcés-Jaraba, Á. (2014). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecno Lógicas*, 18, 109-123.
- Umesh , G., Kaura, M. P., Jawab, G., & Suda, D. (2010). Removal of cadmium (II) from aqueous solutions by adsorption on agricultural waste biomass. *Journal of Hazardous Materials*, 1149–1157.
- Vegliò, F., Beolchinia, F., Pagnanelli, F., & Toro, L. (2010). *A methodological approach to investigate the pH effect on biosorption*

process: experimental and modeling procedures Paper presented at
the "Biohydrometallurgy: a sustainable technology in evolution"
Athens, Hellas

ANEXOS

ANEXO A

Características macroscópicas de las levaduras estudiadas.



R. mucilaginosa



S. cerevisiae.



C. gastricus

ANEXO B

Norma Técnica Ecuatoriana (1984) INEN 0982

Norma Técnica Ecuatoriana	AGUA POTABLE. DETERMINACIÓN DE CADMIO METODO DE LA DITIZONA	INEN 982
<p style="text-align: center;">0. INTRODUCCION</p> <p>0.1 El cadmio puede estar presente en el agua como resultado de la contaminación con desechos industriales o por el deterioro de las tuberías galvanizadas.</p> <p>0.2 El cadmio es un metal altamente tóxico y se le ha atribuido varios casos de envenenamiento alimenticio.</p> <p>0.3 El método de la ditizona es satisfactorio para el análisis de cadmio en agua potable. Una muestra sintética desconocida que contenía: 50 µg/l Cd, 500 µg/l Al, 110 µg/l Cr, 470 µg/l Cu, 300 µg/l Fe, 70 µg/l Pb, 120 µg/l Mn, 150 µg/l Ag y 650 µg/l Zn, fue analizada por 44 laboratorios con una desviación estándar relativa del 24,6% y un error relativo del 6,0%.</p> <p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Establecer el método de la ditizona para determinar el contenido de cadmio en agua potable.</p> <p style="text-align: center;">2. FUNDAMENTO</p> <p>2.1 El cadmio bajo condiciones apropiadas reacciona con la ditizona (difeniltiocarbazona), con la formación de un complejo coloreado o quelato de color rosado a rojo que puede ser extraído cuantitativamente de un medio-acuoso con cloroformo. En la capa orgánica puede determinarse espectrofotométricamente el cadmio, y la concentración se obtiene a partir de una curva de calibración preparada con soluciones patrón tratadas de la misma forma que la muestra.</p> <p style="text-align: center;">3. DISPOSICIONES GENERALES</p> <p>3.1 Interferencias.</p> <p>3.1.1 En las condiciones que se lleva acabo la determinación por este método, las concentraciones de iones metálicos normales encontrados en el agua potable no interfieren.</p> <p>3.1.2 El plomo en concentraciones de hasta 6 mg, el zinc hasta 3 mg y el cobre hasta 1 mg en la alícuota analizada no interfieren.</p> <p>3.1.3 La luz ordinaria del laboratorio no afecta el color del complejo cadmio-ditizona.</p> <p>3.2 La cantidad mínima detectable es de 0,5 µg Cd con una celda de 2 cm .</p> <p>3.3 La conservación de la muestra puede hacerse con HNO₃ a pH2 hasta 6 meses en recipientes de plástico o de vidrio.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p>		

4. EQUIPOS

4.1 Equipo colorimétrico. Se requiere uno de los siguientes:

5.7 Cloroformo, grado ACS, para utilizar en análisis de ditizona. La prueba para un cloroformo satisfactorio se realiza añadiendo una pequeña cantidad de ditizona en una porción de CHCl_3 , en un tubo de ensayo con tapa, de tal forma que se produzca un ligero color verde; el color verde debe ser estable por un día.

5.8 Solución de ácido tartárico. Disolver 20 g de $\text{H}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ en agua destilada y llevar a 1 000 cm^3 . Guardar la solución en el refrigerador; debe usarse aun fría.

5.9 Solución patrón de ditizona. Diluir 100 cm^3 de solución madre de ditizona a 1 000 cm^3 con cloroformo. Guardar en un frasco obscuro en el refrigerador y dejar que adquiera la temperatura ambiente antes de utilizarla.

5.10 Acido clorhídrico, HCl concentrado.

5.11 Solución de hidróxido de sodio Na OH, 6N.

5.12 Solución indicadora de azul de timol. Disolver 0,4 g de timol sulfonaphthalina de sodio en 100 cm^3 de agua destilada.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Tratamiento de las muestras.

6.1.1 A un volumen de 200 cm^3 de muestra adicionar 0,5 cm^3 de HCl concentrado y evaporar hasta un volumen de 20 cm^3 .

6.1.2 Añadir unas pocas gotas de la solución azul de timol y luego solución de Na OH 6N, hasta que el indicador vire a amarillo a un pH aproximado de 2,8, llevar a un volumen de 25 cm^3 con agua destilada en el embudo de separación.

6.1.3 Si no se prepara la curva de calibración en el mismo momento, debe prepararse un blanco y un patrón que contenga 6 μg Cd en un volumen final de 25 cm^3 y correr juntamente con la muestra.

6.2 Desarrollo de color, extracción y medida.

6.2.1 A la muestra preparada según 6.1, añadir los reactivos en el siguiente orden, mezclando después de cada edición: 1 cm^3 de solución de tartrato de sodio y potasio, 5 cm^3 de solución 1 de NaOH - KCN, 1 cm^3 de solución de clorhidrato de hidroxilamina y 15 cm^3 de solución madre de ditizona. Tapar el embudo y agitar por 1 minuto eliminando la presión de vapor por la tapa preferentemente que por la llave.

6.2.2 Eluir la capa de cloroformo, CHCl_3 , en un segundo embudo que contenga 25 cm^3 de solución de ácido tartárico frío. Añadir 10 cm^3 de CHCl_3 al primer embudo, agitar por un minuto y eluir la capa orgánica en el segundo embudo. Evitar que la capa acuosa entre en el segundo embudo durante estas operaciones. Realizar las 2 extracciones en un tiempo mínimo, para evitar que el contacto entre el cloroformo y la solución alcalina sea muy prolongado y se descomponga el complejo ditizona-cadmio.

(Continúa)

6.2.3 Agitar el segundo embudo por 2 minutos y descartar la capa de cloroformo. Añadir al embudo 5 cm³ de CHCl₃, agitar por un minuto y descartar la capa de CHCl₃, permitiendo que la separación sea lo más definida posible.

6.2.4 Al residuo, en el embudo, adicionar en el siguiente orden, 0,25 cm³ clorhidrato de hidroxilamina y 15 cm³ de solución patrón de ditizona, 5 cm³ de la solución (hidróxido de sodio-cianuro) II de NaOH - KCN e inmediatamente agitar por un minuto. Insertar un tapón de algodón en el vástago del embudo y filtrar la capa clorofórmica en un tubo seco del fotómetro.

6.3 Leer la absorbancia a 518 nm utilizando el blanco como referencia.

6.4 Obtener la concentración de cadmio por comparación con la curva de calibración (ver 7).

7. CURVA DE CALIBRACION

7.1 Pipetear 0,0; 2; 4; 6; 8 y 10 µg de cadmio en una serie de embudos de separación. Añadir suficiente agua destilada para llevara un volumen final de 25 cm³.

7.2 Tratar a cada solución patrón (7.1) como se indica en (6.2).

7.3 Leer la absorbancia 518 m utilizando el patrón 0,0 µg Cd como referencia y graficar la curva concentración versus absorbancia.

8. CÁLCULOS

8.1 El contenido de cadmio se determina mediante la siguiente ecuación, cuando se usa como referencia el patrón de 6 µg (ver 6.1.3).

$$\frac{mg}{l} \text{ Cd} = \frac{A2 \times C}{A1 \times S}$$

Siendo:

A1 = absorbancia del patrón tomado.

A2 = absorbancia de la muestra de agua.

C = µg de cadmio en el patrón tomado.

S = cm³ de la muestra tomados para el análisis.

8.2 Cuando se ha preparado la curva de calibración y se obtiene la concentración de la muestra por comparación con la absorbancia del problema.

$$\frac{mg}{l} \text{ Cd} = \frac{m}{\text{cm}^3 \text{ de muestra}}$$

(Continúa)

9. ERROR ACEPTABLE

9.1 La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder del 3% del promedio de ambos valores; en caso contrario, debe repetirse la determinación.

10. INFORME DE RESULTADOS

10.1 Como resultado final, debe reportarse la media aritmética de los resultados de la determinación en mg/Cd.

10.2 Deben indicarse el método usado y el resultado obtenido; debe mencionarse, además, cualquier condición no especificada en esta norma, o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.

10.3 Deben incluirse todos los datos necesarios para la completa identificación de la muestra.

(Continua)

ANEXO C

Parámetros estadísticos para las curvas realizadas

Tabla 1*Parámetros estadísticos para la curva McFarland.*

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

Tabla 2*Parámetros estadísticos para la curva de calibración de cadmio*

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

ANEXO D

Comparación del método de la ditizona con el método de absorción atómica.

Tabla 1

Estándares de 214 $\mu\text{g/l}$ de cadmio analizados por el método de la ditizona antes y después de la digestión.

Estándares (214 $\mu\text{g/l}$)	Concentración $\mu\text{g/l}$	
	Antes de la digestión	Después de la digestión
1	175,00	183,00
2	183,00	175,00
3	170,00	174,00
4	172,00	170,00
5	173,00	169,00
6	171,00	167,00

Tabla 2

Prueba t Student de los estándares de 214 $\mu\text{g/l}$ de cadmio determinado por el método de la ditizona de las muestras antes y después de la digestión

	Antes de la digestión	Después de la digestión
Media	174	173
Varianza	22,4	33,2
Observaciones	6	6
Coeficiente de correlación de Pearson	0,381364522	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	0,415227399	
P(T<=t) una cola	0,347596148	
Valor crítico de t (una cola)	2,015048373	
P(T<=t) dos colas	0,695192296	
Valor crítico de t (dos colas)	2,570581836	

Los valores de t calculados son menores a los valores de t críticos, por lo tanto se infiere que no existe diferencia significativa en las concentraciones de los estándares de 214 $\mu\text{g/l}$ de cadmio antes ni después de la digestión.

Tabla 3

Estándares de 214 µg/l de cadmio analizados por el método de la ditizona y por el método de absorción Atómica

Estándares (214 µg/l)	Concentración µg/l	
	Después de la digestión	Abs. Atómica
1	183,00	170
2	175,00	150
3	174,00	300
4	170,00	250
5	169,00	150
6	167,00	180

Tabla 4

Prueba t Student de los estándares de 214 µg/l de cadmio analizados por el método de la ditizona y por el método de absorción Atómica

	Después de la digestión	ABS ATOMICA
Media	173	200
Varianza	33,2	3760
Observaciones	6	6
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,073588573	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	-1,066546814	
P(T<=t) una cola	0,167472263	
Valor crítico de t (una cola)	2,015048373	
P(T<=t) dos colas	0,334944526	
Valor crítico de t (dos colas)	2,570581836	

Los valores de t calculados son menores a los valores de t críticos, por lo tanto se infiere que no existe diferencia significativa en entre métodos de análisis.

Tabla 5

Soluciones de 34240 microgramos de cadmio por litro analizados por el método de la ditizona, antes y después de la digestión

Solución de CdCl ₂ 34240 µg/l	Concentración µg/l	
	Antes de la digestión	Después de la digestión
1	162,000	158,000
2	157,000	161,000
3	159,000	164,000
4	146,000	162,000
5	164,000	172,000
6	169,000	174,000

Tabla 6

Prueba t Student del efecto de la dilución en las concentraciones por el método de la ditizona de las muestras antes y después de la digestión

	Antes de la digestión	Después de la digestión
Media	159,5	165,1666667
Varianza	61,1	40,96666667
Observaciones	6	6
Coeficiente de correlación de Pearson	#N/A	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	-2,145206477	
P(T<=t) una cola	0,042378625	
Valor crítico de t (una cola)	2,015048373	
P(T<=t) dos colas	0,08475725	
Valor crítico de t (dos colas)	2,570581836	

Los valores de t calculados son menores a los valores de t críticos, por lo tanto se concluye que no existe diferencia significativa en las concentraciones de las soluciones de 34240 microgramos de cadmio por litro antes ni después de la digestión.

Tabla 7

Soluciones de 34240 microgramos de cadmio por litro analizados por el método de la ditizona y por el método de absorción Atómica

Solución de CdCl ₂ 34240ug/l	Concentración µg/l	
	Después de la digestión	Abs. Atómica
1	158,000	200
2	161,000	150
3	164,000	60
4	162,000	120
5	172,000	130
6	174,000	110

Tabla 8

Prueba t Student del efecto de la dilución en las concentraciones por el método de la ditizona y por el método de absorción Atómica

	Después de la digestión	ABS ATOMICA
Media	165,4	142
Varianza	50,8	1270
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,732283465	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1,27173913	
P(T<=t) una cola	0,136188463	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	0,272376925	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Los valores de t calculados son menores a los valores de t críticos, por lo tanto se deduce que no existe diferencia significativa en entre métodos de análisis.

Tabla 9

Muestras del proceso de remoción de cadmio mediante levaduras analizadas por el método de la ditizona antes y después de la digestión

Muestras	Concentración µg/l	
	Antes de la digestión	Después de la digestión
muestra del proceso de remoción de Cd con levaduras -01	111,000	144,000
muestra del proceso de remoción de Cd con levaduras -02	69,000	98,000
muestra del proceso de remoción de Cd con levaduras -03	62,000	107,000
muestra del proceso de remoción de Cd con levaduras -04	56,000	56,000
muestra del proceso de remoción de Cd con levaduras -05	91,000	76,000

Tabla 10

Prueba t Student de muestras del proceso de remoción de cadmio mediante levaduras analizados por el método de la ditizona, antes y después de la digestión

	Antes de la digestión	Después de la digestión
Media	86,83333333	107,5
Varianza	905,3666667	1651,9
Observaciones	6	6
Coefficiente de correlación de Pearson	0,829560232	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	-2,202517948	
P(T<=t) una cola	0,039421758	
Valor crítico de t (una cola)	2,015048373	
P(T<=t) dos colas	0,078843517	
Valor crítico de t (dos colas)	2,570581836	

Los valores de t calculados son menores a los valores de t críticos, por lo tanto se concierne que no existe diferencia significativa en las muestras del

proceso de remoción de cadmio mediante levaduras analizados por el método de la ditizona, antes y después de la digestión

Tabla 11

Muestras del proceso de remoción de cadmio mediante levaduras analizadas por el método de la ditizona y por el método de absorción Atómica

Muestras	Concentración µg/l	
	Después de la digestión	Abs. Atómica
muestra del proceso de remoción de Cd con levaduras -01	144,000	320
muestra del proceso de remoción de Cd con levaduras -02	98,000	550
muestra del proceso de remoción de Cd con levaduras -03	107,000	250
muestra del proceso de remoción de Cd con levaduras -04	56,000	600
muestra del proceso de remoción de Cd con levaduras -05	76,000	90

Tabla 12

Prueba t Student muestras del proceso de remoción de cadmio mediante levaduras analizadas por el método de la ditizona y por el método de absorción Atómica

	Después de la digestión	ABS ATOMICA
Media	154	316,6666667
Varianza	9203,6	59026,66667
Observaciones	6	6
Coefficiente de correlación de Pearson	0,906817313	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	-2,47306965	
P(T<=t) una cola	0,028158851	
Valor crítico de t (una cola)	2,015048373	
P(T<=t) dos colas	0,056317702	
Valor crítico de t (dos colas)	2,570581836	

Los valores de t calculados son menores a los valores de t críticos, por lo tanto se infiere que no existe diferencia significativa en entre métodos de análisis.