



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Química e Ingeniería Química
Unidad de Posgrado

**Desarrollo de un proceso con aplicación de biomasa
para remoción de plomo disuelto de las Aguas
Superficiales procedentes del ACR Humedales de
Ventanilla**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ingeniería Química

AUTOR

Narda Stella FAJARDO VIDAL

ASESOR

Dr. Jorge Luis WONG DÁVILA

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Fajardo, N. (2023). *Desarrollo de un proceso con aplicación de biomasa para remoción de plomo disuelto de las Aguas Superficiales procedentes del ACR Humedales de Ventanilla*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios: autor/asesor

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Narda Stella Fajardo Vidal
DNI	40013789
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3508-8324
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Jorge Luis Wong Dávila
DNI	08216792
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9211-8652
Datos del jurado	
Presidente del Jurado	
Nombres y apellidos	Pedro Luis Castellanos Sánchez
DNI	09649588
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Oscar Gerardo Marín Flores
DNI	08587163
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Gladys Constanza Arias Arroyo
DNI	06518454
Datos de investigación	
Línea de investigación	Biotecnología
Grupo de investigación	Bioprocesos y Bioingeniería de Fermentaciones
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. PROCENCIA. Contrato 04 – 2018 – FONDECYT/BM
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Servicios Analíticos Generales S. A.C (SAG) País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Urbanización: Chacra Ríos, Av. Naciones Unidas N°1565 Latitud: -12.052055 Longitud: -77.060601
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2023
URL de las disciplinas OCDE	Ingeniería química https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.04.01 Biotecnología ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.08.01



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
VICEDECANATO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
UNIDAD DE POSGRADO
"Año de la Unidad, de la Paz y el Desarrollo"

UNIDAD DE POSGRADO
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PRESENCIAL
GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR

A los siete días del mes de julio del año dos mil veintitres, a las 9:00 horas en el auditorio Cerseu de la Facultad de Química e Ingeniería Química, se reunió el Jurado de Tesis presidido por el Ph.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez, el Ph.D. Oscar Marín Flores, la Dra. Gladys Constanza Arias Arroyo y el Dr. Jorge Wong Dávila, para calificar la sustentación de la tesis titulada: **"Desarrollo de un proceso con aplicación de biomasa para remoción de plomo disuelto de las Aguas Superficiales procedentes del ACR Humedales de Ventanilla"**, presentado por la Mg. Narda Stella Fajardo Vidal, para optar el Grado Académico de Doctor en Ingeniería Química.

Realizada la sustentación de tesis de acuerdo al Art. 72 del Reglamento General de Estudios de Posgrado, aprobado con R.R. N° 04790-R-18 del 8 de agosto del 2018 y conforme a lo dispuesto en la RR. N° 002995-2021-R/UNMSM con fecha 01 de abril de 2021 el jurado acordó la siguiente calificación:

Dieciocho (18) Muy Bueno

Habiendo sido aprobada la sustentación de la tesis, el Jurado recomendó que la Facultad proponga que se le otorgue el Grado Académico de Doctor en Ingeniería Química, a la **Mg. Narda Stella Fajardo Vidal**.

El acto académico de sustentación concluyó a las 11:00 horas.

Ph.D. Oscar Marín Flores
Miembro

Dra. Gladys Constanza Arias Arroyo
Miembro

Dr. Jorge Wong Dávila
Asesor

Ph.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez
Presidente



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

"Año de la Universalización de la Salud"

Informe de Evaluación de Originalidad

Director de la Unidad de Posgrado:
Operador:

Prof. Marcos A. Loroño G., PhD
Prof. Marcos A. Loroño G., PhD

Tesis: "Desarrollo de un proceso con aplicación de biomasa para la remoción de plomo disuelto de las Aguas Superficiales procedentes del ACR Humedales de Ventanilla"

Tesista:

Narda Stella Fajardo Vidál

Recepción de documento:

16/12/22

Aplicación del software:

03/01/23

Software utilizado:

Turnitin

Configuración del software:

- Excluir material bibliográfico
- Excluir material citado
- Excluir fuentes pequeñas N° palabras: 40
- Sin depósito

Resultado del análisis con el software: cero por ciento (0%) de fuentes de originales.

Observaciones: **Ninguna**

La tesis se encuentra depositada desde:

El documento cumple los criterios de originalidad.

Sin observaciones.

Fecha del informe: 4/01/2023



UNMSM

Firmado digitalmente por LOROÑO
GONZALEZ Marcos Antonio FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 04.01.2023 17:30:05 -05:00

Prof. Marcos A. Loroño G., PhD.
DIRECTOR UNIDAD DE POSGRADO

DEDICATORIA

A Dios por su infinito amor y misericordia.

En memoria de mi amada madre fallecida en octubre del 2022

A mi padre, hermanas, primas y primos

A mi Asesor Doctor Jorge Luis Wong Dávila.

A Doctora Eliana Jara Morante por su confianza y apoyo.

A Doctor Oscar Perales Pérez a quien Dios tenga en su gloria.

AGRADECIMIENTO

_ Al Dr. Jorge Luis Wong Dávila, asesor de la presente tesis, por su invaluable apoyo y dedicación durante la formulación, desarrollo, revisión y mejoras del trabajo de investigación y artículos de investigación.

_ Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en el marco del Doctorado becado por ProCiencia – Banco Mundial, por el financiamiento otorgado para el desarrollo del presente trabajo.

Esta investigación ha sido financiada por el Proyecto Concytec-Banco Mundial "Mejoramiento y Expansión de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica" 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia [Contrato 04-2018-FONDECYT/BM], con el objetivo de contribuir a la investigación en líneas prioritarias que incluye ecosistemas frágiles como los Humedales Costeros.

_ A la Dr. Eliana Jara Morante, por brindarme la oportunidad de compartir sus conocimientos y por su importante contribución a la formulación y desarrollo de la presente investigación.

_ A los profesores y personal administrativo de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por su colaboración para la culminación del presente trabajo.

_ Al Doctor Waldir Estela Escalante por su permanente apoyo y colaboración durante el desarrollo de la presente investigación.

_ A mi familia, amigos y a todas las personas que hicieron posible la conducción y desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras.....	ix
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Situación Problemática.....	1
1.2 Formulación del Problema.....	3
1.3 Justificación de la Investigación.....	3
1.3.1 Justificación Técnica.....	3
1.3.2 Justificación Económica.....	4
1.3.3 Justificación Social.....	5
1.4 Objetivos.....	5
1.4.1 Objetivo General.....	5
1.4.2 Objetivos Específicos.....	6
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Antecedentes.....	7
2.2 Bases Teóricas.....	21
2.2.1 Metales pesados.....	21
2.2.2 Plomo.....	22
2.2.3 Cadmio.....	22
2.2.4 Metales pesados en cuerpos de agua.....	24
2.2.5 Operaciones unitarias de separación y purificación.....	24
2.2.6 Adsorción.....	26
2.2.7 Biosorción de metales pesados.....	27
2.2.8 Mecanismo de biosorción.....	29
2.2.9 Isotermas de adsorción.....	31
2.2.10 Reino Fungi.....	32
2.2.11 Toxicidad por metales pesados en levaduras.....	33

2.2.12	Detoxificación de metales en levaduras.....	34
2.2.13	Metalotioneínas.....	34
2.2.14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2.2.15	<i>Candida guilliermondii</i>	35
2.3	Términos Conceptuales – Glosario.....	35
	• Adsorbente.....	35
	• Adsorción.....	36
	• Agua subterránea.....	36
	• Agua superficial.....	36
	• Biomasa.....	36
	• Biorremediación.....	37
	• Coloración gram.....	37
	• Humedal.....	37
	• ICP-MS.....	38
	• Metales pesados.....	38
	• Piezómetro.....	38
	• Sorción.....	38
	CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA.....	39
3.1	Tipo y diseño de investigación.....	39
3.2	Unidad de los análisis.....	39
3.3	Población de estudio	39
3.4	Tamaño de muestra.....	40
3.5	Selección de muestra.....	40
3.6	Recolección.....	41
3.7	Aislamiento de microorganismos.....	41
3.7.1	Screening primario.....	42
3.8	Aislamiento de levaduras y selección de levaduras.....	43
3.9	Identificación de microorganismos.....	45
3.10	Análisis de metales totales.....	46
3.10.1	Análisis de metales totales en levadura activa.....	46
3.10.2	Análisis de metales totales en levadura inactivada y muerta.....	46
3.11	Matrices de optimización.....	47
3.11.1	Matriz experimental 1.....	47
3.11.1.1	Evaluación de la remoción de Pb en presencia de Cd como levaduras inactivadas y muertas en agua desionizada a pH6.....	47

3.11.1.2 Evaluación de la remoción de Pb en presencia de Cd con levadura residual cervecera.....	48
3.11.1.3Evaluación de la remoción de Pb en presencia de Cd con matriz estructural de levadura comercial <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con tierra de diatomea.....	48
3.11.2Matriz experimental 2: Diseño experimental con biomasa de levadura muerta-determinación de un modelo multivariado predictivo para la variable de respuesta porcentaje de Pb removido en presencia de Cd.....	49
3.11.3Matriz experimental 3: Prueba de Optimización con biomasas de levaduras muertas en agua del ACR-HV para la remoción de Pb con presencia de Cd a las condiciones óptimas.....	49
3.11.4Matriz experimental 4: Modelamiento con biomasa de levadura muerta para determinar un modelo ajustado según Langmuir/Freundlich.....	50
3.12Tratamiento de los datos.....	50
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
4.1 Resultados de la fase de campo.....	52
4.1.1 Valores de concentración de Pb en las estaciones de muestreo del Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla entre 2015 y 2022.....	59
4.2 Resultados de la fase de laboratorio.....	60
4.2.1 Identificación de levaduras aisladas del ACR-HV.....	61
4.2.2 Levaduras aisladas del ACR HV tolerantes a diferentes concentraciones de Pb.....	62
4.3 Matriz experimental 1.....	65
4.4 Resultados de la matriz experimental 1.....	66
4.4.1 Resultados de remoción como levaduras inactivadas y muertas con dos tratamientos térmicos de desactivación de biomasa a 45°C y 121°C.....	70
4.5 Matriz experimental 2.....	73
4.6 Resultados de la matriz experimental 2.....	76
4.7 Matriz experimental 3.....	78
4.8 Resultados de la matriz experimental 3.....	79
4.9 Matriz experimental 4.....	83
4.10 Resultados de la matriz experimental 4.....	83
4.11 Resultados de modelos cinéticos de sorción.....	87
CONCLUSIONES.....	95
RECOMENDACIONES.....	98
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXOS.....	109

ANEXO 01: Artículo de investigación publicado	109
ANEXO 02: Permiso para la investigación del Gore Callao	111
ANEXO 03: Informe de laboratorio	114
ANEXO 04: Reactivación de levadura comercial	117
ANEXO 05: Cepario medio YPG pH 5.5.....	118
ANEXO 06: Aislamiento de microorganismos del ACR Humedales de Ventanilla.....	119
ANEXO 07: Aislamiento de microorganismos sospechosos de ser levaduras a cepario en tubos con medio YPG.....	120
ANEXO 08: Microscopio de las levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla.....	121
ANEXO 09: <i>Candida guilliermondii</i> en cámara Neubauer.....	122
ANEXO 10: Observación al microscopio de las levaduras aisladas.....	123
ANEXO 11: Identificación de levaduras con el kit API 32 C a partir de cultivos puros.....	124
ANEXO 12: Procesamiento de la matriz de diseño experimental.....	125
ANEXO 13: Procesamiento de matriz experimental 3.....	126
ANEXO 14: Equipo de optimización empleado en la tesis doctoral.....	127
ANEXO 15: Certificado de análisis del Kit API 32C.....	128

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentración de Pb (mg/L) en cuerpos de agua en el Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla durante el año 2019 y 2020 ...	54
Tabla 2: Concentración de Cd (mg/L) en cuerpos de agua en el Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla durante el año 2019 y 2020....	55
Tabla 3: Concentración de Pb y adicionalmente Cd en los cuerpos de agua del Area de Conservación Regional Humedales de Ventanilla durante el 2022, concentración expresada en mg/L	56
Tabla 4: Parámetros de campo de las estaciones de muestreo.....	56
Tabla 5: Identificación de levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla en matraces de 250 ml con 100ml de caldo YPG y en caldo YPG-Pb (Se aislaron aplicando el protocolo de la Figura 6)	61
Tabla 6: Levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla tolerantes a diferentes concentraciones de Pb a 24°C	62
Tabla 7: Levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla tolerantes a diferentes concentraciones de Pb a 30°C	63
Tabla 8: Levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla tolerantes a diferentes concentraciones de Pb a 36°C	64
Tabla 9: Matriz experimental 1 para determinar tipo de levadura activa más eficiente.....	65
Tabla 10: Recuento en placas de la población final microbial al término del proceso de remoción de Pb como biomasa activa de levadura en la matriz experimental 1.....	67
Tabla 11: Diseño experimental de matriz 2.....	74
Tabla 12: Metodología superficie de respuesta / optimización.....	75
Tabla 13: Valores de concentración y granulometría analizados en la matriz 2: Diseño experimental central compuesto (CCD) para optimización de valores de variables.....	76
Tabla 14: Características de la matriz experimental 3.....	78
Tabla 15: Pesos recuperados después del proceso de remoción de Pb y Cd en las tres matrices estructurales muertas evaluadas.....	80
Tabla 16: Características del modelamiento con biomasa muerta para la determinación del modelo que representa el proceso de remoción de en presencia de Cd.....	83
Tabla 17: Isotermas de adsorción.....	87

Tabla 18: Porcentajes de remoción R de Pb en presencia de Cd para *Candida guilliermondii* muerta a 121 °C y secada a 100°C en agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla con 0.5g de sorbato inicial 89

Tabla 19: Porcentajes de remoción R de Pb en presencia de Cd para *Candida guilliermondii* muerta a 121 °C y secada a 100°C en agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla con 1 g de sorbato inicial..... 90

Tabla 20: Porcentajes de remoción R de Pb en presencia de Cd para *Saccharomyces cerevisiae* muerta a 121 °C y secada a 100°C en agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla con 1 g de sorbato inicial..... 91

Tabla 21: Pesos recuperados del bioadsorbente después del proceso de remoción de Pb en presencia de Cd para biomasa de *Candida guilliermondii* muerta a 121 °C y secada a 100°C en agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla con 0.5 g de sorbato inicial..... 92

Tabla 22: Pesos recuperados del bioadsorbente después del proceso de remoción de Pb en presencia de Cd para biomasa de *Candida guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae* muertas a 121 °C y secadas a 100°C en agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla con 1 g de sorbato inicial..... 93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Remediación ambiental de metales pesados mediada por microbios	23
Figura 2: Operaciones unitarias en la recuperación de productos.....	25
Figura 3: Representación gráfica de (a) principio de intercambio iónico, (b) principio de adsorción, y (c) principio de microprecipitación	27
Figura 4: Clasificación de los procesos de biosorción con base en su asociación con el metabolismo y con el sitio donde ocurre la biosorción	30
Figura 5: Esquema de Screening primario de microorganismos presentes en el ACR Humedales de Ventanilla que permitió ajustar el segundo protocolo de la figura 6.....	42
Figura 6: Esquema de aislamiento de levaduras procedentes del ACR Humedales de Ventanilla.....	44
Figura 7: Esquema de identificación bioquímica con Kit API 32.....	45
Figura 8: Esquema de trabajo en campo	52
Figura 9: Ubicación de estaciones de muestreo en el Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla.....	53
Figura 10: Isolínea de Pb del Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla.....	57
Figura 11: Isolínea de Cd del Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla.....	58
Figura 12: Valores de concentración de Pb en las estaciones de muestreo del Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla	59
Figura 13: Concentración de Pb (mg/L) durante remoción por <i>Candida guilliermondii</i> como biomasa de levadura activa	66
Figura 14: Concentración de Pb (mg/L) durante remoción por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como biomasa de levadura activa	67
Figura 15: Concentración de Pb y Cd (mg/L) durante adsorción por biomasa inactivada de <i>Candida guilliermondii</i> a pH 6 y con dos diferentes tratamientos térmicos de desactivación de biomasa (levadura inactivada a 45°C y levadura muerta a 121°C).....	70
Figura 16: Concentración de Pb y Cd (mg/L) durante adsorción por biomasa inactivada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a pH 6 y con dos diferentes tratamientos térmicos de desactivación de biomasa (levadura inactivada a 45°C y levadura muerta a 121°C)	71

Figura 17: Concentración de Pb y Cd (mg/L) durante adsorción por biomasa muerta de levadura cervecera residual (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) con tratamiento térmico de desactivación de 80°C.....	72
Figura 18: Concentración de Pb y Cd (mg/L) durante adsorción por biomasa muerta de levadura comercial <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con tierra de diatomea con tratamiento térmico de desactivación de 100°C	72
Figura 19: Optimización de variable granulometría D50 en sorbente (sólido) de acuerdo a la concentración de Pb y Cd, para cualquier concentración inicial de metal pesado $[X]_0$ y hasta tiempo de operación. (a), (b), (c) y (d) muestran un valor óptimo aprox. D50 = 1.0 mm para una eficiente adsorción de Pb. (e), (f), (g) y (h) muestran un valor óptimo aprox. D50 = 1.5 mm para una eficiente adsorción de Cd acompañante.....	77
Figura 20: [Pb] (mg/L) durante el proceso de remoción en las tres matrices estructurales muertas en presencia de Cd evaluadas en agua del ACR Humedales de Ventanilla.....	79
Figura 21: [Cd] (mg/L) durante el proceso de remoción de Pb en las tres matrices estructurales muertas evaluadas	79
Figura 22: Ajuste de modelo de adsorción de Pb por biomasa muerta de <i>Candida guilliermondii</i>	84
Figura 23: Ajuste de modelo de adsorción de Pb por biomasa muerta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Candida guilliermondii</i>	84
Figura 24: Ajuste de modelo de adsorción de Cd por biomasa muerta de <i>Candida guilliermondii</i>	85
Figura 25: Ajuste de modelo de adsorción de Cd por biomasa muerta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Candida guilliermondii</i>	85
Figura 26: Proceso de trabajo con los filtros	94
Figura A.4: Esquema de reactivación de cepa comercial <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	117
Figura A.5: Cepario de levaduras codificadas	118
Figura A.6: Aislamiento de microorganismos en el screening primario.....	119
Figura A.7.1: Medios de cultivo para el mantenimiento de cepas de levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla.....	120
Figura A.7.2: Siembra de las cepas de levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla en medio YPG	120
Figura A.8.1: <i>Candida guilliermondii</i>	121
Figura A.8.2: <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	121
Figura A.8.3: <i>Cryptococcus humicola</i>	121
Figura A.9: Cepa J1-JJJ <i>Candida guilliermondii</i> como levadura activa	122
Figura A.10.1: Cepa comercial <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	123
Figura A.10.2: Observación al microscopio de levadura comercial	123
Figura A.11.1: Levadura <i>Candida guilliermondii</i>	124

Figura A.11.2: Lectura de la prueba API 32C	124
Figura A.12.1: Toma de muestras de la matriz de diseño experimental.....	125
Figura A.12.2: Las muestras se colectaron en tubos Falcon estériles.....	125
Figura A.13.1: Matrices estructurales de levaduras inactivadas.....	126
Figura A.13.2: Matraces con agua del ACR Humedales de Ventanilla.....	126
Figura A.13.3: Sistema de matriz experimental 3 después de 1h a 30°C a 150 rpm.....	126
Figura A.14.1: Cabina de flujo laminar	127
Figura A.14.2: Shaker incubador (equipo de optimización)	127

RESUMEN

En la actualidad, uno de los problemas que afectan a ecosistemas frágiles tales como los humedales costeros a escala global es la contaminación por metales pesados en los cuerpos de agua.

El Area de Conservación Regional Humedales de Ventanilla (ACR HV), localizado en la región Callao en Perú, es un área de conservación que presenta alta concentración de metales pesados particularmente Plomo (Pb) y Cadmio (Cd) en sus cuerpos de agua.

Las levaduras (activas o muertas) tienen un gran potencial de aplicación como biosorbentes para muchas clases de contaminantes inorgánicos, incluyendo Pb en humedales costeros. Entre los procesos de separación para una potencial remoción de metales pesados del agua, la adsorción/biosorción podría presentar un mecanismo técnico y económicamente factible.

Con el objetivo de proponer una alternativa entre proceso biológico y de ingeniería química para la remediación de los humedales en cuestión, se investigó para (a) determinar la presencia de potenciales microorganismos (levaduras nativas) en el Area de Conservación Regional (ACR) Humedales de Ventanilla, y (b) evaluar la capacidad sorbente a Pb de las levaduras nativas que mostraron mayor tolerancia al Pb en el estudio

Se realizó el aislamiento de levaduras nativas del ecosistema ACR-HV de las estaciones de muestreo más críticas; las levaduras aisladas presentaban elevada tolerancia a Pb, destacando la levadura *Candida guilliermondii*.

Se seleccionó a la levadura nativa *Candida guilliermondii* para realizar pruebas de bioadsorción a través de un diseño experimental donde se le comparó con una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* en la forma de levaduras activas.

Se elaboró una matriz de diseño experimental factorial 2^3 con tres réplicas se estudió las levaduras en estado inactivado (muerto): Se comparó *Candida guilliermondii* con una levadura residual de proceso cervecero y con una mezcla de levadura comercial instantánea con tierra de diatomea aplicadas a muestras de agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla, con parámetros operativos 150 rpm y 30°C durante 7 h para el sistema de sorción, en el cual *Candida guilliermondii* obtuvo los mejores resultados de remoción.

Finalmente, en otra matriz de diseño experimental se evaluaron las levaduras *Candida guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae*; la levadura que presentó mejores resultados de remoción de Pb fue la levadura nativa *Candida guilliermondii* como levadura muerta a 121°C y secada a 100°C con granulometría D50 1 mm y una relación 0.5 g levadura inactivada (sorbente) por 100 ml de agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla en comparación con la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* con granulometría D50 0.5 mm y una relación 1g levadura inactivada (sorbente) por 100 ml agua del ACR HV, en un sistema con un volumen de control a escala laboratorio operado a 150 rpm y 30°C durante un tiempo máximo de 4 h. La isoterma de adsorción de Freundlich fue la que mejor se ajustó a los resultados obtenidos en el trabajo experimental. Se concluye que *Candida guilliermondii* presentó una mejor eficiencia en remoción de Pb como levadura muerta en agua procedente del ACR-HV

Palabras Claves

Levadura, *Candida guilliermondii*, ACR Humedales de Ventanilla, bioadsorción, Pb

ABSTRACT

Currently, one of the problems affecting fragile ecosystems such as coastal wetlands on a global scale is heavy metal contamination in water bodies.

The Ventanilla Wetlands Regional Conservation Area (ACR HV), located in Callao region (Perú), is a conservation area that has a high concentration of heavy metals, particularly Lead (Pb) and Cadmium (Cd) in its water bodies.

Yeasts (active or dead) have great application potential as biosorbents for many classes of inorganic pollutants, including Pb in coastal wetlands. Among the separation processes for a potential removal of heavy metals from water, adsorption/biosorption could present a technically and economically feasible mechanism.

With the objective of proposing an alternative between biological process and chemical engineering for the remediation of the wetlands in question, an investigation was carried out to (a) determine the presence of potential microorganisms (native yeasts) in the Regional Conservation Area (ACR) Wetlands of Ventanilla, and (b) evaluate the sorbent capacity to Pb of the native yeasts that showed greater tolerance to Pb in the study.

The isolation of native yeasts from the ACR-HV ecosystem of the most critical sampling stations was carried out; the isolated yeasts presented high tolerance to Pb, highlighting the yeast *Candida guilliermondii*.

The native yeast *Candida guilliermondii* was selected to perform biosorption tests through an experimental design where it was compared with a commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* in the form of active yeasts.

A 2³ factorial experimental design matrix was elaborated with three replicates. The yeasts were studied in an inactivated (dead) state: *Candida guilliermondii* was compared with a residual yeast from the brewing process and with a mixture of instant commercial yeast with diatomaceous earth applied to samples of water from the ACR Ventanilla Wetlands, with operating parameters 150 rpm and 30°C for 7 h for the sorption system, in which *Candida guilliermondii* obtained the best removal results.

Finally, in another matrix of experimental design, the yeasts *Candida guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae* were evaluated; The yeast that presented the best Pb removal results was the native yeast *Candida guilliermondii* as dead yeast at 121°C and dried at 100°C with a D50 1 mm granulometry and a ratio of 0.5 g inactivated yeast (sorbent) per 100 ml of water from the ACR Wetlands of Ventanilla in comparison with the commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* with D50 0.5 mm granulometry and a ratio of 1g inactivated yeast (sorbent) per 100 ml of ACR HV water, in a system with a control volume on a laboratory scale operated at 150 rpm and 30°C for a maximum time of 4 h. The Freundlich adsorption isotherm was the one that best adjusted to the results obtained in the experimental work. It is concluded that *Candida guilliermondii* presented a better efficiency in Pb removal as dead yeast in water from ACR-HV.

Keywords

Yeast, *Candida guilliermondii*, ACR Ventanilla Wetlands, biosorption, Pb

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática

De acuerdo al tratado intergubernamental de Ramsar (Secretaría de la Convención de Ramsar, 2013), los humedales son aquellos ecosistemas que tienen al agua como factor principal, controlando el medio y la vida tanto vegetal como animal presente en éste, y cuya conservación y uso debe darse de modo sostenible. Cabe resaltar que los humedales se encuentran en espacios donde la napa freática se halla en la superficie o en espacios caracterizados por sus suelos cubiertos por aguas poco profundas. (Secretaría de la Convención de Ramsar, 2013)

Dentro de los humedales costeros en Perú, uno de los que ha sido investigado y estudiado en los últimos años es el ACR Humedales de Ventanilla. (Fajardo, 2017). Este ecosistema funciona como lugar de alimento, descanso, refugio y reproducción de aves, y por lo tanto; muestra importancia clave para la conservación de especies de flora y fauna. Este humedal es destinado para usos recreativos de la población, sin embargo, muestra impactos directos e indirectos que degradan la calidad de las lagunas presentes ya que presenta metales pesados en los cuerpos de agua, los que podrían afectar la salud de los pobladores, pues ellos están en constante contacto con el humedal.

Diversos estudios demuestran que varias especies levaduras actúan como biosorbentes de Pb^{2+} en soluciones acuosas (Kordialik Bogacka, 2014; Machado et al., 2010; Monachese, 2012; Wang & Chen, 2009; Zhang et

al., 2011). Entre las levaduras, los géneros más estudiados son *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus* y *Saccharomyces*, siendo esta última muy adecuada para descontaminar el agua para consumo humano, debido a su inocuidad (Wang & Chen, 2009; Hernández et al., 2013; Kulakovskaya et al., 2018).

La presente investigación plantea el aislamiento de levaduras con tolerancia a metales pesados como Pb (Pb), seleccionar la levadura nativa con mayor potencial y compararla con levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, con levadura residual cervecera y con una matriz estructural de levadura comercial con tierra de diatomea con la finalidad de evaluar su porcentaje de remoción de metales pesados del agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla en condiciones controladas de laboratorio.

En el Protocolo Nacional de Monitoreo de la Calidad en Cuerpos Naturales de Agua Superficial (2011) se menciona que: La calidad de los cuerpos naturales de agua superficial está influenciada por diversos factores como: procesos geomorfológicos, ciclo hidrológico, contaminantes físicos, químicos y biológicos; ya sean de carácter natural o de actividades poblacionales y productivas, los cuales modifican las características físicas, químicas y microbiológicas de los mismos.

La calidad de los cuerpos naturales de agua superficial está influenciada por diversos factores, tales como procesos geomorfológicos, ciclo hidrológico, y contaminantes físico-físico-biológicos. Estos últimos ser de carácter natural o pueden provenir de actividades poblacionales y productivas. Entre estos contaminantes críticos se encuentran los metales pesados, los cuales constituyen un riesgo para la salud de las personas y para la salud ambiental del ecosistema en general. En los últimos años se ha medido y hallado alta concentración de algunos metales pesados, tales como Pb en humedales, lo cual indica un potencial peligro de contaminación.

Los humedales costeros pueden potencialmente acumular metales pesados provenientes de actividades humanas tales como minería. Dicha presencia constituye un riesgo para la salud de las personas y para la salud ambiental del ecosistema.

Por otro lado, la evolución biológica ha permitido que dichos ecosistemas puedan albergar una población de microorganismos potencialmente resistentes a dichos contaminantes. En el caso particular de microorganismos, se sabe que ciertas levaduras tienen la capacidad de interactuar con metales pesados y reducir la concentración de dichos contaminantes en las aguas de los humedales, lo cual está basado en aspectos biológicos, físicos y químicos inherentes a la biomasa microbial. En base a este cuadro contextual, el problema general de investigación es planteado mediante la siguiente pregunta:

1.2 Formulación del Problema

¿Existen levaduras nativas del ecosistema ACR Humedales de Ventanilla con la capacidad de remoción de Pb que puedan compararse ventajosamente con una levadura standard comercial como es la *Saccharomyces cerevisiae* en su función de remoción de Pb?

1.3 Justificación de la Investigación

1.3.1 Justificación Técnica

- Nuestro país cuenta con la Estrategia Nacional para la Conservación de Humedales en el Perú, aprobada el 12.03.1996 mediante Resolución Jefatural N.º 054-96-INRENA, la misma que tiene como objetivo fundamental: Promover la conservación de los humedales para obtener beneficios: ecológicos, sociales, económicos, culturales y espirituales como contribución al desarrollo integral del Perú” (Plan Maestro Humedales de Ventanilla 2009-2014).
- Por ello, el aislamiento, identificación y estudio de levaduras nativas de estos humedales son una buena alternativa en programas de biorremediación; en la presente investigación se trabajó con diseños de experimentos orientados a la evaluación

de la levadura nativa con mayor capacidad de tolerancia a Pb y la evaluación de la biomasa de levadura tanto viva como muerta en la remoción de Pb.

- La estrategia para modificar la superficie de la levadura; a fin de mejorar su capacidad de biosorción consistió principalmente en tratamientos térmicos en diferentes matrices sorbentes y en la evaluación de la granulometría, cuyos objetivos fueron aumentar la exposición de sitios de unión (Ahluwalia & Goyal, 2007),
- La biosorción es el método alternativo a las técnicas convencionales para eliminación de metales pesados de soluciones acuosas. La levadura se cultiva fácilmente en cantidades sustanciales utilizando medios de crecimiento económicos y técnicas de fermentación simples. Además, la levadura de desecho recolectada en grandes volúmenes de las producciones cerveceras comerciales es un biosorbente económico y de amplia disponibilidad, miscibilidad y selectividad en metales pesados (Kordialik, 2011).

1.3.2 Justificación Económica

- Esta tesis tuvo como objetivo la evaluación de formas de biomasa viva e inactiva (muerta) de levadura nativa con mayor tolerancia a Pb, de levadura residual cervecera (*Saccharomyces cerevisiae*) y de otras formas de biomasa con capacidad de remoción de Pb, a fin de tener la mejor alternativa económica y con buen porcentaje de remoción de dicho metal pesado. Ello a su vez representaría una potencial alternativa a escala frente a otras operaciones o sistemas más costosos de remoción de metales pesados.

1.3.3 Justificación Social

- Los metales pesados que incluyen al Pb son altamente tóxicos y contaminan las fuentes de agua para consumo. La contaminación proviene principalmente de actividades antropogénicas. Entre las actividades antropogénicas que más contaminan al agua con metales pesados destacan la minería y la metalurgia, y la producción de cromados y pinturas entre otros (Moreno et al., 2018).
- Los metales pesados son considerados contaminantes persistentes que no son biodegradables y tienen tendencia a acumularse a lo largo de la cadena alimenticia, generando problemas de salud (Gavrilescu, 2004). Entre los diversos metales pesados que se utilizan en los procesos industriales, el Pb es uno de los más peligrosos para el medio ambiente, ya que no tiene un uso biológico conocido y es tóxico para la mayoría de las formas de vida (Hlihor & Gavrilescu, 2009).
- Este estudio será de gran utilidad para la comunidad, la cual hace uso del recurso agua para su recreación, y para El Gobierno Regional del Callao como potencial alternativa sostenible de biorremediación, que contribuiría a la mejora de calidad de vida y salud de la comunidad y a la propia conservación del ACR-HV.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Determinar la capacidad de la biomasa levadura para la remoción comparativamente eficiente de Pb en muestras de agua superficial procedentes del ACR Humedales de Ventanilla.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la concentración de Pb y otros metales pesados en los cuerpos de agua del Area de Conservación Regional Humedales de Ventanilla.
2. Aislar levaduras presentes en los cuerpos de agua seleccionados del Area de Conservación Regional Humedales de Ventanilla.
3. Seleccionar levaduras aisladas de los cuerpos de agua del Area de Conservación Regional Humedales de Ventanilla con mayor capacidad de remoción de Pb.
4. Determinar las condiciones óptimas de exposición de las levaduras seleccionadas que conduzcan a una mayor remoción de Pb a nivel laboratorio.
5. Evaluar la eficiencia de la biomasa muerta de levadura en la remoción de Pb de las aguas superficiales procedentes del Area de Conservación Regional Humedales de Ventanilla.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Marques & Pinheiro (2000) analizaron los efectos del pH sobre la retención de Cu^{2+} , Cd^{2+} , y Pb^{2+} de soluciones acuosas utilizando biomasa constituida por levadura residual de un proceso cervecero; comparándose la eficiencia para extraer metales empleando una suspensión de biomasa sin lavar con respecto a biomasa previamente incubada y lavada con agua destilada. Los experimentos con biomasa sin lavar presentaron un desplazamiento del pH del medio de 4.5 a 7-8 al final. Este incremento del pH fue el responsable del efecto de precipitación del metal aunado al de biosorción.

Ting & Sun (2000) emplearon con éxito el modelo de Langmuir y el modelo de Freundlich para simular la absorción de cobre (Cu) por las células inmovilizadas no viables de *S. cerevisiae*; sin embargo, algunas investigaciones indicaron que el modelo simple de Langmuir no es aplicable para los sistemas de biosorción de metales (Vasudevan et al., 2003).

De Silóniz et al. (2002) evaluaron la capacidad de una cepa de la levadura *Pichia guilliermondii*, aislada de lodos de depuradora, para eliminar Cu, utilizando biomasa tanto viable como no viable, determinándose que el aumento de las concentraciones de cobre afecta tanto a la morfología como a los parámetros fisiológicos de la levadura viable, estimándose su influencia en un proceso de bioacumulación en su absorción de cobre. La tasa de crecimiento de las células no adaptadas disminuyó con el aumento de las concentraciones de Cu, principalmente debido a una disminución en el rendimiento de biomasa. Además, se determinó que se acumuló del medio hasta 20 mg Cu por gramo

de biomasa viable adaptada. Finalmente, se encontró que los datos de adsorción en células no viables tuvieron un excelente ajuste por la isoterma de Langmuir.

Wang & Chen (2006) resumieron los hallazgos del campo de la biosorción de metales pesados por *S. cerevisiae*. Sus características en la biosorción de metales pesados fueron analizadas. La biosorción de la levadura depende de diversos parámetros, tales como: el pH, la proporción del ion metálico inicial y la concentración de biomasa inicial, las condiciones de cultivo, la presencia de varios ligandos e iones metálicos competitivos en solución y, en cierta medida, de la temperatura. Realizaron una evaluación del modelo de equilibrio de isotermas, así como de la cinética.

Li & Yuan (2008) investigaron las respuestas celulares al Cd en la levadura *Rhodotorula sp* Y11. La microscopía electrónica de barrido indicó que la acumulación de Cd en el Y11 no generó ningún efecto visible en la morfología celular. Más del 20 % de las células de levadura mostraron viabilidad después de 15 h de acumulación de Cd por debajo de 100 mg/L. En presencia de Cd, las actividades de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) fueron mayores que las del control, pero el aumento fue independiente de la dosis. Los cambios en las actividades de SOD y CAT también dependieron del tiempo de exposición. Por lo tanto, sugiere que las defensas antioxidantes tienen un papel importante en la tolerancia al Cd en *Rhodotorula sp*. Y11.

Rodríguez et al. (2008) investigaron los efectos de las variables pH, concentración de iones, presencia de electrólitos, concentración y tratamiento de biomasa sobre la biosorción de iones Pb^{2+} , Cd^{2+} y cromo (Cr^{3+}) en soluciones mediante el uso de *Saccharomyces cerevisiae* no viva. El pH, la concentración de biomasa y el tratamiento previo tuvieron un efecto significativo sobre la biosorción de Pb^{2+} . Para la biosorción del Cr^{3+} solo fueron significativos los efectos del pH y la concentración de biomasa, mientras que para la biosorción del Cd^{2+} fueron significativos los efectos de la concentración de biomasa, el pH y la presencia de todos los co-iones presentes en solución.

Vimala & Das (2009) investigaron la capacidad de sorción de los hongos ostra (*Pleurotus platypus*), champiñón (*Agaricus bisporus*) y hongo lechoso (*Calocybe indica*) sobre la biosorción de metales pesados: Cd (II) y Pb (II), a partir de soluciones acuosas. Las condiciones óptimas de sorción se estudiaron para cada metal por separado. Se encontró que el pH deseado de la solución acuosa era 6.0 para la eliminación de Cd (II) y 5.0 para la eliminación de Pb (II) para todos los hongos. El porcentaje de eliminación de ambos metales aumentaba con el aumento de la dosis de biosorbente y el tiempo de contacto. Investigaron la aptitud de los datos de biosorción para los modelos de adsorción de Langmuir y Freundlich, determinándose que la biosorción de iones de Cd (II) y Pb (II) en la biomasa de los tres hongos era la más adecuada para el modelo de adsorción de Langmuir que para el de Freundlich. *P. platypus* mostró el mayor potencial de absorción de metal para Cd (q_{\max} 34.96 mg/g) mientras que *A. bisporus* exhibió el máximo potencial para Pb (q_{\max} 33.78 mg/g). El hongo lechoso mostró la capacidad de absorción de metal más baja para ambos metales. Los datos confirmaron que los hongos pueden usarse como biosorbentes eficientes para la eliminación de iones de Cd (II) y Pb (II) de una solución acuosa.

Chandra et al. (2010) en los estudios de monitoreo de la calidad del agua de los humedales de Coimbatore, en la India, mostraron la caída en la calidad del agua, lo cual supone un considerable impacto en la biota acuática, la salud pública y la calidad del agua subterránea.

Rehman & Anjum (2010) evaluaron la capacidad de absorción de Cd por la levadura *Candida tropicalis*. La concentración inhibitoria mínima de Cd²⁺ frente a *C. tropicalis* fue 2.500 mg/L. La levadura también mostró tolerancia hacia Zn²⁺ (1400 mg/L), Ni²⁺ (1000 mg/L), Hg²⁺ (1400 mg/L), Cu²⁺ (1000 mg/L), Cr⁶⁺ (1200 mg/L) y Pb²⁺ (1.000 mg/L). El aislado de levadura mostró curvas de crecimiento típicas, pero las fases de adaptación y logaritmo se prolongaron en presencia de Cd. El aislado de levadura mostró un crecimiento óptimo a 30°C y pH 8. La capacidad de procesamiento de metales del aislado se determinó en un medio que contenía 100 mg/L de Cd²⁺. *C. tropicalis* disminuyó el contenido de Cd²⁺ en un 70 %, 85% y 92% del medio después de

48, 96 y 144 h, respectivamente. *C. tropicalis* redujo el 40 % y el 78 % de Cd^{2+} de las aguas residuales después de 6 y 12 días, respectivamente. El Cd produjo un aumento en los niveles de glutatión (GSH) y tiol no proteico en un 135 % y 134 % a una concentración de 100 mg/L, respectivamente. Finalmente, demostraron que *C. tropicalis* es resistente a los iones de metales pesados y se adapta a las condiciones ambientales locales y puede emplearse para operaciones de desintoxicación de metales.

Van der Heggen et al. (2010) investigaron el efecto del Pb sobre la estructura y función de las células de *Saccharomyces cerevisiae*. La integridad de la membrana se evaluó por la liberación de compuestos absorbentes de UV y por la salida de K^+ intracelular. En dicha investigación no se detectaron fugas de compuestos absorbentes de UV 260 ni pérdida de K^+ en las células tratadas con Pb (hasta 1000 $\mu\text{mol/l}$) hasta 30 min. El efecto del Pb sobre el metabolismo de la levadura se realizó utilizando la sonda fluorescente FUN-1 y se comparó con la capacidad de reproducción, evaluada mediante el conteo de unidades formadoras de colonias. La exposición de células de levadura, durante 60 min a 1000 $\mu\text{mol/l}$ Pb, induce una disminución de la capacidad de procesar FUN-1 aunque las células conservan su capacidad de proliferación. Un tiempo de contacto más prolongado (120 min) de las células de levadura con Pb induce una pérdida marcada (> 50%) de la actividad metabólica de las células de levadura y de la capacidad de replicación a través de un mecanismo que requiere la síntesis de proteínas.

Akpomie et al. (2012) investigaron el potencial de la arcilla Ehandiagu como adsorbente para la eliminación de iones Pb (II) de soluciones acuosas, analizando el efecto de la concentración inicial de iones metálicos mediante el método por lotes, obtuvieron un pH óptimo de 5.0 y un tiempo de contacto de 2 horas. El resultado determinó un aumento en la capacidad de adsorción con el aumento de la concentración inicial de iones metálicos. En términos de porcentaje adsorbido, se observaron una disminución al aumentar la concentración de iones metálicos. El parámetro de regresión de la isoterma de equilibrio (R^2) determinó que la isoterma de Langmuir (0.9787) y la isoterma de Freundlich (0.9298) obtuvieron un excelente ajuste y el que menos fue la

isoterma de Dubinin-Radushkevich (0.8001). El valor de la energía aparente de adsorción obtenido de la isoterma de Dubinin-Radushkevich (28,87 J/mol) indica un proceso de adsorción física. Los parámetros obtenidos de la isoterma de Langmuir y Freundlich determinaron que la adsorción de iones Pb (II) en arcilla Ehandiagu es un proceso de adsorción favorable, demostrándose que la aplicabilidad de la arcilla Ehandiagu como adsorbente bueno y económico para la eliminación de Pb (II) de efluentes acuosos.

Infante et al. (2014) emplearon la biomasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para retener Pb, mercurio y níquel en forma de iones disueltos en agua, preparándose soluciones sintéticas que contenían los tres metales pesados, las cuales se pusieron en contacto con el microorganismo a diferentes condiciones de pH, temperatura, aireación y agitación. Tanto las variables individuales como los efectos de interacción influyeron sobre el proceso de biosorción. Observaron que la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* redujo un mayor porcentaje de Pb (86.4%) en comparación al Hg y al Ni (69.7 y 47.8% respectivamente). Cuando el pH se fijó en valor de 5, el efecto fue positivo para los tres metales, determinándose que el pH fue la variable que tuvo una mayor influencia en la biosorción de Pb sobre la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Sahan & Ozturk (2014) investigaron la adsorción de Pb (II) en piedra pómez recolectadas en la región del Monte Ararat (Turquía) en un sistema por lotes. Los efectos combinados e individuales de los parámetros operativos sobre la adsorción se analizaron utilizando una metodología de superficie de respuesta de varios pasos. En el primer paso, los factores más efectivos, son la concentración inicial de Pb (II), el pH y la temperatura, determinándose mediante un diseño factorial fraccionado. Luego, utilizaron el ascenso/descenso más pronunciado seguido del diseño compuesto central para interpretar las condiciones óptimas de adsorción para la mayor eliminación de Pb (II), determinaron que las condiciones óptimas de adsorción eran una concentración inicial de Pb (II) de 84.30 mg/l, un pH de 5.75 y una temperatura de 41.11°C. En condiciones óptimas, la capacidad de adsorción de Pb (II) de la piedra pómez fue de 7.46 mg/g según un rendimiento de eliminación del

88.49 %. Los datos obtenidos concordaban con un modelo cinético de segundo orden y tuvieron un ajuste excelente a la isoterma de Langmuir. Finalmente, determinaron que la piedra pómez es un material adsorbente adecuado para la adsorción de Pb (II) en soluciones acuosas.

Dutta et al. (2015) investigaron las propiedades de biosorción de la biomasa de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) tratada con etilendiaminotetraacetato (EDTA) para la eliminación de Cd, Pb y Cu de aguas residuales industriales preparadas artificialmente. Los iones metálicos los seleccionaron para estudios de biosorción con respecto a su disponibilidad en la industria y el impacto potencial de la contaminación. La capacidad óptima de biosorción de estos iones metálicos sobre la biomasa se obtuvieron a pH 5. Observaron que la capacidad de sorción de la biomasa tratada con EDTA aumenta cuando aumenta la concentración inicial de los iones metálicos. Los modelos de isoterma de Langmuir y Freundlich se utilizaron para ajustar los datos experimentales de equilibrio de biosorción. La capacidad de biosorción máxima determinada mediante la isoterma de Langmuir fue de 32, 200 y 17 mg/g para los iones Cd (II), Pb (II) y Cu (II), respectivamente. La cinética de la biosorción se estudió usando modelos de pseudo primer y pseudo segundo orden.

Basándose en un coeficiente de correlación de regresión lineal, determinaron que la cinética de tasa de absorción de metal de pseudo segundo orden proporciono el mejor ajuste.

Farhan & Khadom (2015) evaluaron el desempeño de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* para remover metales pesados de soluciones acuosas, analizando el efecto del pH, la temperatura, la concentración inicial, el tiempo de contacto y la dosis de biosorbente sobre la capacidad de biosorción. Los resultados del experimento ilustraron que la absorción de metales es un proceso rápido a valores de pH (5.0–6.0), y el orden de los iones metálicos acumulados fue Pb > Zn > Cr > Co > Cd > Cu. El proceso de biosorción fue modelado por las isotermas de adsorción de Freundlich y Langmuir. Demostraron que los grupos carboxilo, amina y fosfato presentes en la levadura son los principales sitios de biosorción para los iones metálicos.

Fazli et al. (2015) aislaron cepas fúngicas tolerantes de sitios contaminados con Cd. Determinaron la tolerancia al Cd y la capacidad de biorremediación de siete aislamientos, incluidos *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Terichoderma sp.*, *Microsporium sp.*, *Cladosporium sp.* Los valores mínimos de concentración inhibitoria entre 1000 y 4000 mg/L demostraron una gran capacidad de las cepas aisladas para sobrevivir en ambientes contaminados con Cd. El hongo más tolerante, *Aspergillus versicolor*, mostró un índice de tolerancia de 0.8 en 100 mg/L de medio de agar Cd. La resistencia fúngica contra el Cd depende directamente de la función biológica de la cepa. Determinaron que *Aspergillus versicolor* bioacumula más de 7 mg de Cd por 1 g de micelio, seguido de 5.878, 5.243, 5.075 y 4.557 de *Paecilomyces sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium sp.* y *Terichoderma sp.*, respectivamente. Demostraron que *Aspergillus versicolor* es un hongo adecuado para los procesos de biorremediación.

Nacu et al. (2015) estudiaron la adsorción de iones Pb (II) sobre lignina activada térmicamente en un sistema discontinuo con la finalidad de analizar el uso potencial de este material como adsorbente económico para la eliminación rápida y eficiente de iones Pb (II) de aguas contaminadas. Los experimentos lo realizaron en función de la concentración inicial de Pb (II) y el tiempo de contacto en condiciones experimentales óptimas (pH de solución inicial de 6 para una dosis de adsorbente de 5.0 g/L), obtuvieron que la lignina térmicamente activada remueve más del 99 % de Pb (II) de soluciones acuosas y el proceso de adsorción ocurre en un tiempo inferior a 5 minutos, demostraron el uso de la lignina térmicamente activada como un adsorbente potencial para la eliminación de iones Pb (II) en tales situaciones.

Zhang et al. (2015) investigaron el comportamiento de adsorción de los iones Cr (VI) de una solución acuosa por una cepa tolerante al cromo, a través de experimentos por lotes. Un aislado designado como Zer-1 fue identificado como una especie de *Bosea* sobre la base de los resultados del 16S ARNr, determinándose una resistencia máxima a 550 mg/L Cr (VI). Analizaron los efectos de 3 parámetros operativos tales como: el pH de la solución inicial, la

concentración inicial de Cr (VI) y la dosis de biomasa, mediante un diseño compuesto central. Obtuvieron la máxima eficiencia de eliminación de Cr (VI) en las siguientes condiciones: pH 2, concentración inicial de iones metálicos 55 mg/L, y dosis de biomasa 2 g/L. En condiciones óptimas, determinaron que la máxima eficiencia de eliminación de iones Cr (VI) fue 98%. Los datos experimentales ilustraron un mejor ajuste con el modelo de Langmuir que con el modelo de Freundlich.

Zhao et al. (2015) desarrollaron la levadura de desecho de la industria de la fermentación cervecera, para adsorber el Ag (I) en una solución acuosa. El resultado del análisis FTIR de la levadura residual indicó que el intercambio iónico, la quelación y la reducción fueron los principales mecanismos de unión entre los iones de plata y los sitios de unión en la superficie de la biomasa. Los experimentos cinéticos revelaron que el equilibrio de sorción se obtuvo en 60 minutos y que la eficiencia de eliminación de Ag (I) fue 93% cuando la concentración inicial de Ag (I) estaba por debajo de 100 mg/L. Parámetros termodinámicos del proceso de adsorción (ΔG , ΔH y ΔS) identificaron que la adsorción era un proceso espontáneo y exotérmico, concluyendo que la levadura de desecho contribuye en la adsorción eficiente de los iones de plata.

Ferdous et al. (2016) evaluaron la aplicabilidad mediante una investigación experimental de cromo del proceso de biosorción empleando levadura de panadería. Estudiaron los parámetros de operación, tales como: el tiempo de incubación, el pH, la cantidad de biosorbente y la concentración de metales pesados para investigar su impacto en la eficiencia de eliminación, determinándose que la tasa de remoción era inversamente proporcional a las concentraciones iniciales de Cr (+6); sin embargo, la tasa de remoción por unidad de biomasa no dependía de las concentraciones iniciales de Cr (+6). Determinaron que el proceso de biosorción era más eficiente a un pH más bajo y exhibió una menor eliminación con el aumento del pH de la solución. El tiempo de incubación óptimo que obtuvieron estuvo entre 6 y 8 horas y el pH óptimo para la solución de iones metálicos fue 2.

Quinaluisa et al. (2016) analizaron la resistencia a estrés por metales pesados de levaduras aisladas del canal de riego Latacunga-Salcedo- Ambato (ciudad de Latacunga, Ecuador), con la finalidad de evaluar la resistencia de levaduras autóctonas del sector frente al estrés por metales pesados obtuvieron una elevada resistencia a Pb (76.92%). Cinco cepas de levaduras mostraron tolerancia a todos los metales pesados sometidos al estudio (*Pichia kluyveri*, *Candida oleophila*, *Pichia fermentans*, *Cystofilobasidium infirmominatum* y *Metschnikowia pulcherrima*).

Zhunio et al. (2016) reportó la valoración de Hongos Filamentosos Nativos del Bosque Protector Aguarongo (provincia de Azuay, Ecuador) en la biosorción de metales pesados, con el propósito de valorar hongos filamentosos nativos del Bosque Protector Aguarongo en la biosorción de metales pesados (Pb, Cr y Hg), reportaron el mayor índice de biosorción (89 mg/l) para la cepa Y1 (*Trichoderma sp*) para el Pb.

Wu et al. (2016) revisaron la literatura sobre la toxicidad y los mecanismos correspondientes asociados con el Pb, Hg, Cd y As, individualmente y como mezclas, en el medio ambiente. En esta revisión, el principal mecanismo asociado con las toxicidades de los metales individuales fue la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, las toxicidades se expresaron a través del agotamiento del glutatión y la unión a grupos sulfhidrilo de proteínas. Determinaron que el Pb se vuelve tóxico para los organismos a través del agotamiento de los antioxidantes, mientras que el Cd genera indirectamente ROS por su capacidad para reemplazar el hierro y el cobre. Las ROS generadas a través de la exposición al arsénico lo asociaron con diversos modos de acción, descubrieron que las mezclas de metales pesados tienen efectos variados en los organismos.

Fajardo et al. (2017) en los estudios llevados a cabo, en los cuerpos de agua del Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla, Región Callao, Perú, determinaron contenidos en metales pesados mediante el método de Inducción de Plasma Acoplada (ICP), permitiendo el establecimiento de una línea base de 47 parámetros incluidos los metales pesados. Dentro de los

metales pesados analizados, el de mayor preocupación fue el Pb ya que estuvo presente en valores que excedían el ECA Agua 2017 en 14 de las 17 estaciones de muestreo.

Hilhor et al. (2017) establecieron los parámetros óptimos para la biosorción de Pb (II) por organismos vivos y muertos a partir de solución acuosa de *Arthrobacter viscosus*. Ellos determinaron que a un pH inicial de 4 y 26°C, la biomasa muerta eliminó el 97% de 100 mg/L de Pb (II), mientras que la biomasa viva eliminó el 96% de 100 mg/L de Pb (II) a un pH inicial de 6 y 28±2°C. Los resultados lo determinaron a partir de diversos modelos cinéticos e isotérmicos para descubrir el mecanismo de eliminación de Pb (II) de *Arthrobacter viscosus*. Los resultados del modelo indicaron que la biosorción de Pb (II) por *Arthrobacter viscosus* se basó en una reacción química y que la sorción se produjo en los grupos funcionales en la superficie de la biomasa. También demostraron la idoneidad de la biomasa viva como biosorbente en forma de biopelícula inmovilizada sobre soportes de polietileno en forma de estrella.

Oke et al. (2017) investigaron la eliminación de metales del grupo del platino (PGM) de una corriente de proceso industrial diluida utilizando una columna de lecho empacado de biomasa de levadura residual tratada con etanol e inmovilizada en yeso de París (POP). El estudio también incluyó la eliminación de metales base y otros elementos traza en solución diluida, determinándose los efectos del caudal de alimentación y la profundidad del lecho sobre las características de penetración del sistema de adsorción. Los resultados determinaron que la eliminación se vio favorecida por velocidades de flujo más bajas y profundidades de lecho más altas.

Aguinaga et al. (2018) emplearon un sistema de humedales fluviales contaminados por drenaje de ácido de minas (AMD) para realizar análisis de secuencias de ARNr de comunidades microbianas que desempeñan un papel en las actividades biogeoquímicas vinculadas a la mejora de la calidad del agua. La secuenciación de próxima generación de amplicones del gen 16S rRNA bacteriano de muestras de sedimentos de ríos y humedales identificó

variaciones en la estructura y diversidad de la comunidad bacteriana sobre la base de concentraciones de metales disueltos, concentraciones de metales en sedimentos, pH y conductividad del agua. El análisis de reconstrucción metabólica predijo la abundancia de vías metabólicas microbianas y reveló diferencias entre las muestras que se agrupan en función de la gravedad de la contaminación por AMD. Pronosticaron que la actividad metabólica global sería significativamente mayor en los sedimentos de humedales en contraste con los sedimentos de ríos contaminados, lo que indica una respuesta de esfuerzo metabólico a la contaminación por AMD.

De Rossi et al. (2018) estudiaron el potencial de los tratamientos químicos y térmicos empleando *Saccharomyces cerevisiae* como biosorbentes para eliminar cromo (VI), eliminando el contenido de Cr (VI) al 99.66%. Las variables principales que determinaron la biosorción fueron el pH, la concentración inicial de Cr (VI) y el tiempo de contacto. Las isotermas de biosorción se representaron mediante la isoterma de Freundlich para la biomasa sin tratar, el modelo BET para la biomasa tratada químicamente y el modelo de Langmuir para la biomasa tratada térmicamente. El tratamiento térmico aumentó la afinidad de biosorción de la biomasa por el cromo y el tratamiento químico incrementó la formación de una multicapa.

Igiri et al. (2018) estudiaron la capacidad de biorremediación de los microorganismos en el contexto de la protección ambiental, demostrándose que el uso de biopelículas ha contribuido con el aumento en la eliminación de metales pesados como tecnología medioambiental sostenible.

Moreno et al. (2018) realizó la descontaminación de arsénico, Cd y Pb en agua por biosorción con *Saccharomyces cerevisiae* y su comparación con la capacidad de biosorción con otros biosorbentes, para las estrategias de mejorar la capacidad de biosorción, la revisión concluye con la necesidad de optimizar las condiciones para su uso en gran escala y explorar otras posibilidades, como la inmovilización por encapsulamiento.

Pratush et al. (2018) realizaron un análisis de los efectos adversos de cuatro metales pesados (arsénico, Pb, mercurio y cromo) y su efecto adverso sobre el medio ambiente y el ser humano. Además, también investigaron el uso de microorganismos/organismos genéticamente modificados para la biorremediación de metales pesados del medio ambiente junto con su mecanismo de biorremediación.

Wang et al. (2018) en su investigación seleccionaron dos especies de algas (*Saccharina japonica* y *Sargassum horneri*) a través de la comparación de los contenidos de estroncio en seis especies de algas y exploraron su potencial para eliminar estroncio de baja concentración del agua de mar en condiciones de cultivo. Determinaron que la biosorción de estroncio en *Saccharina japonica* y *Sargassum horneri* aumentó con el incremento de las concentraciones de estroncio en el agua de mar y *Sargassum horneri* adsorbió más estroncio que *Saccharina japonica*. El proceso de biosorción de estroncio de *Sargassum horneri* se ajustó al modelo cinético de pseudo-segundo orden, lo que implica que la adsorción fue el paso limitante de la velocidad del proceso de biosorción. Los resultados sugieren que *Saccharina japonica* y *Sargassum horneri* son biosorbentes eficientes para la eliminación in situ de estroncio del agua de mar contaminada por energía nuclear.

Campaña et al. (2019) estudiaron la eficiencia de adsorción de tres especies de levaduras nativas del Ecuador (*Kazachstania yasuniensis*, *Kodamaea transpacificica* y *Saturnispora quitensis*) para la remoción de Cr (VI) de aguas residuales simuladas, tomando *Saccharomyces cerevisiae* como referencia. Después de romper los flóculos de levadura con un tensioactivo catiónico, se estudió la capacidad de adsorción, la cinética y las isothermas de biosorción. El rendimiento de *Kodamaea transpacificica* presentó la eficiencia más alta entre las cuatro levaduras probadas, como resultado de su combinación ventajosa de carga superficial, tamaño de celda individual (4.04 μm) y área superficial (1588.3 m^2/L). El rendimiento de *Saturnispora quitensis* fue similar. Las notables capacidades de biosorción de estos dos aislados (476.2 y 416.7 mg de Cr (VI)/g de levadura, respectivamente) evidencian el potencial de especies de

levaduras no convencionales como partículas microbianas de biosorción para la remediación de aguas contaminadas.

Bruna Silva et al. (2019) demostraron que los biosorbentes basados en residuos son alternativas ecológicas y rentables a los adsorbentes comerciales para la retención de productos farmacéuticos.

Muñoz et al. (2019) evaluaron los microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú) en su investigación determinaron el grado de tolerancia a metales pesados de hongos y bacterias aisladas de suelos con el propósito de conocer su potencial para aplicaciones de biorremediación. La cepa de hongo con mejor índice de tolerancia fue *Fusarium temperatum* CTLM05 para el Pb.

Lavado et al. (2020) investigaron la remoción de Pb de soluciones acuosas por biomasa de los cladodios de la tuna (BCT). Las propiedades físicas y químicas de la BCT se determinaron por técnicas de FTIR y SEM/ EDX. El análisis FTIR confirmó la presencia de grupos $-OH$, $CO-C$, $C=O$ y $-NH_2$, los cuales interactuarían con el metal. La micrografía SEM determinó que la morfología superficial de la BCT tiene porosidad adecuada para la biosorción. En un sistema discontinuo se obtuvo la más alta capacidad de biosorción (q_e) con una relación masa BCT/volumen de 4 g/L, pH 4.5 y tiempo de contacto de 1 h. La biosorción se ajustó a un modelo cinético de pseudo-segundo orden y el proceso de difusión intraparticular fue el factor principal de control de la velocidad. Los datos en el equilibrio fueron correlacionados con cinco modelos (Langmuir, Freundlich, Temkin, D-R y Redlich-Peterson) y se ajustaron mejor al modelo de Langmuir, lo que indica que el proceso se realiza en centros activos energéticamente homogéneos, el valor de q_e máxima fue 50.25 mg/g. Los resultados obtenidos demuestran que la BCT puede ser usada como biosorbente eficiente para el tratamiento de aguas contaminadas con Pb (II).

Alegre & Gutiérrez (2021) trataron el efluente minero de Ticapampa con biomasa seca *Serratia marcescens* M8a-2T para remover contaminantes como Cd y Pb. Aplicaron la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) y la

matriz de diseño de Box- Behnken para optimizar el proceso, evaluaron la influencia del pH (2, 3 y 4), concentración de biomasa (1, 2 y 3 mg/mL) y tiempo de contacto (15, 30 y 45 minutos). El porcentaje máximo de remoción para Cd fue 97.11% a pH 4; 2 mg/mL de biomasa durante 45 minutos; y para Pb fue 98.63% a pH 4; 1 mg/mL de biomasa durante 30 minutos. Los altos niveles de significación ($p < 0.05$) de los modelos de regresión y ANOVA determinaron que el pH es el factor más influyente.

Blagojev (2021) estudió la eficiencia de la biosorción de iones de cobre y cromo utilizando diferentes fuentes de biomasa de residuos agrícolas: fragmentos de remolacha azucarera, aserrín de álamo y paja de trigo, aplicándose un modelo sigmoideal paralelo (PS) para describir el proceso de biosorción. Los resultados mostraron que la biosorción de iones de cobre utilizando aserrín de álamo y paja de trigo consta de dos pasos. La fracción de un paso en el proceso general, definida por el parámetro p , se determinó en 0.85 para aserrín de álamo y 0.86 para paja de trigo. Estos valores, al ser menores que 1, indican que el proceso consta de dos pasos simultáneos, cinéticamente diferentes, que cambian de dominio sobre el proceso, por lo tanto, se ajustan mediante el modelo PS.

Joo et al. (2021) investigaron el efecto de la modificación química y el medio de cultivo sobre las características superficiales y la capacidad de adsorción de metales pesados de *Chlorella vulgaris* como biosorbente. El tratamiento con hidróxido de sodio sobre las células de la superficie en los agregados celulares, produjo estructuras rugosas a microescala en la superficie del biosorbente, aumentando el área superficial específica en 19 veces y la capacidad de adsorción de metales pesados en factores de 2.4 a 4.1.C. La incubación de *Chlorella vulgaris* con medio rico en nitrógeno y fósforo optimizó la capacidad de adsorción, mostrando factores de aumento de 1.6 a 9.4 en comparación con el uso de un medio mínimo.

Montalvo et al. (2022) realizaron una investigación experimental de la adsorción de Cd empleando cascarilla de arroz convencional y modificada con hidróxido de sodio, evaluándose la influencia de las variables pH,

concentración inicial de Cd y dosificación de adsorbente en el proceso de adsorción. Utilizaron espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y microscopio electrónico de barrido (SEM), ambas técnicas identificaron la morfología de los dos tipos de cascarilla de arroz. Obtuvieron como resultados, que la eficiencia máxima de adsorción fue 92.65 %. El pH óptimo de adsorción para ambos tipos de cascarilla de arroz fue 7. Las capacidades máximas de adsorción para la cascarilla de arroz convencional y para la cascarilla de arroz modificada químicamente ajustadas por el modelo de Langmuir fueron 5.13 mg/g y 11.06 mg/g, respectivamente. La cinética de pseudosegundo orden obtuvo los mejores coeficientes de determinación de la cascarilla de arroz convencional ($R^2 = 0.992$) y de la cascarilla de arroz modificada químicamente ($R^2 = 0.999$). Se determinó que el proceso de adsorción era de naturaleza endotérmica con una entalpía de 14.08 kJ/mol y una entropía de 170.98 J/mol.K. La energía de activación calculada fue 24 kJ/mol. Los resultados anteriormente descritos, demostraron que la cáscara de arroz es un biosorbente económico y eficiente para la eliminación de Cd de las aguas.

Pande et al. (2022) investigaron las rutas generadoras de la contaminación de tierras agrícolas con metales pesados, proporcionando una evaluación vital de la capacidad de biorremediación de microorganismos, analizando los procesos de biorremediación de metales pesados, tales como: biosorción, biolixiviación, biomineralización, biotransformación y acumulación intracelular, así como el uso de microbios modificados genéticamente y células microbianas inmovilizadas para la eliminación de metales pesados.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Metales Pesados

La contaminación por metales pesados se ha convertido en uno de los problemas ambientales más graves en la actualidad.

El Plomo (Pb) y el Cadmio (Cd) tienen un efecto nocivo sobre los microbios, dañan las membranas celulares y destruyen la estructura del ADN. Esta nocividad se genera por el desplazamiento de los metales de sus sitios de unión nativos o interacciones con ligandos. La morfología, el metabolismo y el crecimiento de los microbios se ven afectados por el cambio de la estructura del ácido nucleico, lo que provoca alteraciones funcionales, alteración de las membranas celulares, inhibición de la actividad enzimática y fosforilación oxidativa (Igirir et al., 2018).

Entre los impactos que causa el Pb en el ecosistema está la contaminación de cuerpos de agua, disminución de la salud del suelo y stress oxidativo en plantas; en salud pública ocasionan efectos genotoxicidad, neurotoxicidad y mutagenicidad (ver Figura 1).

2.2.2 Plomo

El Pb forma complejos con los grupos oxo en las enzimas que afecta a todos los pasos del proceso de síntesis de hemoglobina y metabolismo de la porfiria (Ademorati, 1996). Los niveles tóxicos de Pb en humanos se han asociado con encefalopatía, convulsiones y retraso mental (Schumann, 1990). La presencia de Pb en el agua potable, incluso en bajas concentraciones, causa enfermedades como anemia, hepatitis, síndrome de nefritis, etc. (Lo et al., 1999). El mayor problema del Pb, con respecto a la salud humana, es la exposición crónica a largo plazo que causa problemas de desarrollo que conducen a una menor inteligencia, menor potencial de ingresos y menores contribuciones positivas a la sociedad. La exposición severa al Pb se ha asociado con esterilidad, aborto, mortinatos y muertes neonatales (Goel et al., 2005).

2.2.3 Cadmio

El Cd induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y, por lo tanto, produce estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y alteración de la homeostasis de ciertos metales esenciales (Nair et al., 2013; Choong et al., 2014; Pereira et al., 2014; Al Kaddisi et al., 2014). Las ROS generadas se dirigen a biomoléculas, como el ADN, los lípidos y las proteínas, y eventualmente inducen la muerte

celular. El Cd está involucrado en la inhibición de las enzimas de reparación del ADN, la desregulación de la proliferación celular, la interferencia con la apoptosis, la interrupción de la adhesión celular, las cascadas de transducción de señales, la autofagia y las funciones supresoras de tumores (Beyersmann & Hartwig, 2008; Wysocki & Tamas, 2010; Muthukumar et al., 2011; Xie et al., 2016).

El Cd tiene una alta afinidad por los grupos sulfhidrilo, carboxilo y fosfato y, por ello, inhibe las enzimas y altera varios procesos metabólicos, incluido el metabolismo de los lípidos (Rogalska et al., 2009). El desequilibrio en el metabolismo de los lípidos conduce a enfermedades cardiovasculares, hígado graso y obesidad (Wenk, 2005).

La forma más grave de toxicidad por Cd en humanos es "itai-itai", una enfermedad caracterizada por un dolor insoportable en los huesos (Kasuya et al., 1992). Otras implicaciones para la salud del Cd en humanos incluyen disfunción renal, daño hepático e hipertensión (Klaassen, 2001).

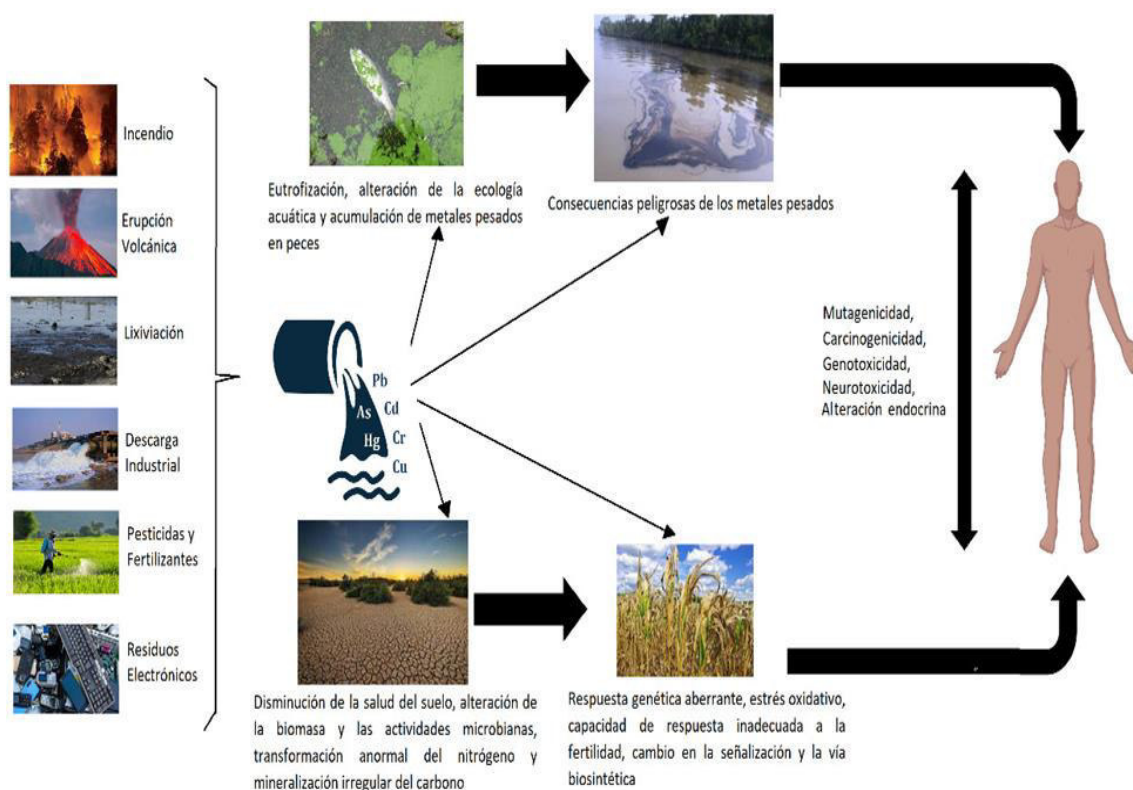


Figura 1: Remediación ambiental de metales pesados mediada por microbios

Fuente. Pande et al., 2022

2.2.4 Metales pesados en cuerpos de agua

El agua es una matriz muy compleja, donde coexisten diversos elementos y ligandos, dificultando el proceso de remoción dirigido hacia determinados metales pesados (Hlihor et al., 2014; Machado et al., 2010). La existencia de otros metales pesados, así como otros iones (K^+ , Na^+ , Mg^{+2} , etc.) en el medio a descontaminar, se asocia a una disminución en la eficiencia de la biosorción, al generar competencia por los sitios de unión. Los aniones o ligandos inorgánicos que se encuentran en el agua son sulfatos, carbonatos, cloruros, fosfatos y fluoruros, formando complejos con iones metálicos cargados positivamente, disminuyendo la capacidad de removerlos (Gadd, 2008).

2.2.5 Operaciones unitarias de separación y purificación

En la Figura 2 se ilustra las diversas operaciones unitarias de ingeniería química aplicables para una efectiva separación de metales pesados, como iones o sólidos, de medios líquidos se encuentran la precipitación, el intercambio iónico, la separación por membrana (particularmente la ósmosis inversa) y la adsorción (ver Figura 3).

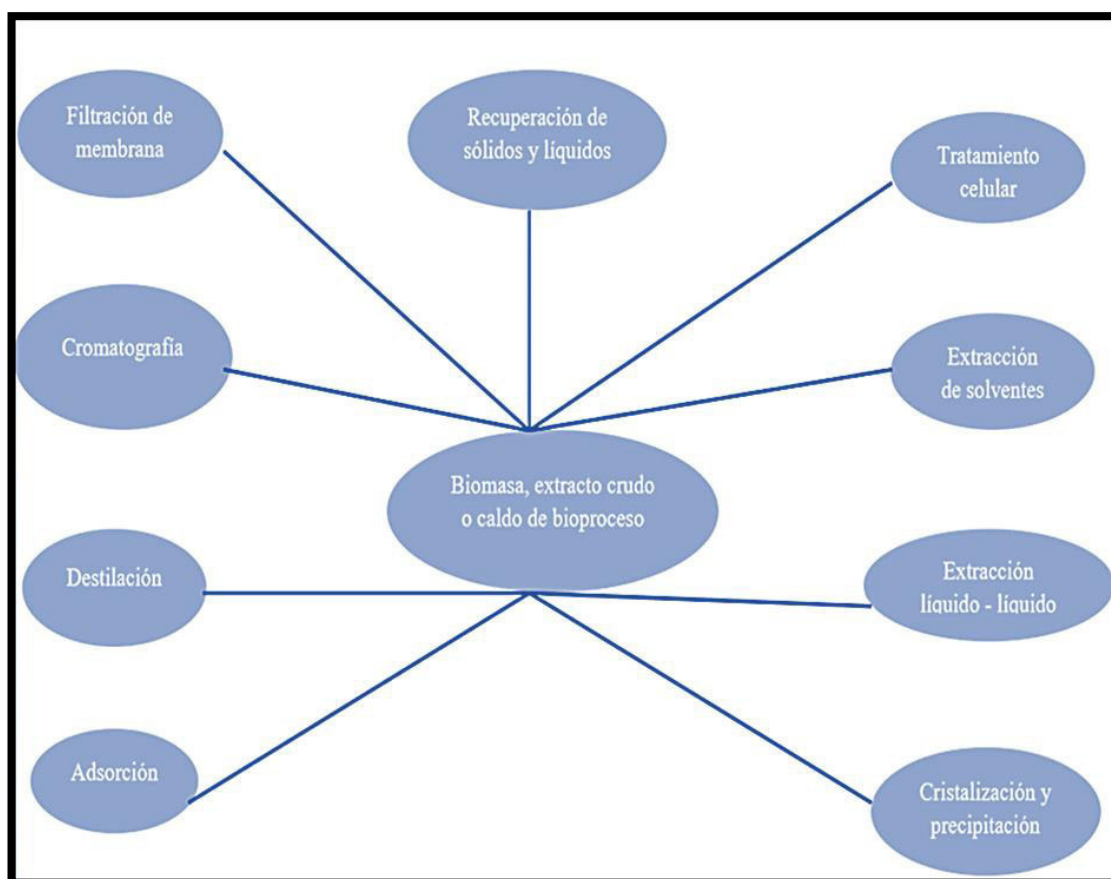


Figura 2: Operaciones unitarias en la recuperación de productos

Fuente. R Wohlgemuth et al., 2011

Mediante la precipitación se separa la fase sólida por una sedimentación en el tiempo.

Intercambio iónico la separación es llevada a cabo mediante intercambio de iones del metal pesado con un complejo electrolítico por ejemplo el empleo de resinas. El ciclo típico de operaciones que involucran resinas de intercambio iónico incluye el pretratamiento de la resina y posiblemente de la solución de alimentación; cargar la resina con los solutos a adsorber al contactar la resina con la solución de alimentación; y elución del material deseado de la resina.

Separación espacial de diferentes moléculas o partículas mediante membranas poliméricas o cerámicas de tamaños de poro definidos, que retienen los productos más grandes que el tamaño de poro y pasan las impurezas o viceversa. La separación mediante membranas se aplica mecanismos de solución-difusión para

la separación selectiva de las moléculas del compuesto deseado a través de una membrana (ultrafiltración / microfiltración / ósmosis inversa).

La naturaleza proporciona los procesos modelos a seguir para la recuperación de productos mediante filtraciones de membrana altamente selectivas y no selectivas a través de las membranas lipídicas naturales de las células biológicas. La mayoría de las separaciones de membrana se realizan en un ambiente acuoso y se basan en las diferencias de tamaño de los componentes a separar.

La microfiltración se aplica para la concentración de células, cristales y precipitados, mientras que la ultrafiltración se aplica para la concentración de productos de alto peso molecular y la separación de biopolímeros de alto peso molecular de subproductos, componentes de medios y sales no deseados de bajo peso molecular.

2.2.6 Adsorción

Esta operación unitaria consiste en la separación de un elemento o una sustancia de una fase mediante mecanismos de interacción superficial del compuesto a ser adsorbido (adsorbato) en otra fase adsorbente (sólida). Ejemplos de adsorbentes standard en la ingeniería de procesos son el carbón activado y las zeolitas entre otros.

El estudio de la adsorción de diversas sustancias sobre superficies sólidas ha revelado que las fuerzas operativas en la adsorción no son las mismas en todos los casos. Generalmente se reconocen dos tipos de adsorción: adsorción "física" o de van der Waals y "química" o quimisorción. La adsorción física (fisorción) es el resultado de las fuerzas intermoleculares de atracción entre las moléculas del sólido y la sustancia adsorbida (Theodore et al., 2017).

Como las características del proceso de adsorción como la capacidad, la selectividad o la cinética no se conocen cuando son levaduras aisladas de ecosistemas naturales, para que el producto se recupere, estos datos deben determinarse experimentalmente. La evaluación de resinas adsorbentes por sus capacidades de recuperación de productos ha sido útil para seleccionar los

adsorbentes más adecuados para la recuperación de moléculas pequeñas como antibióticos (Wohlgemuth et al., 2011).

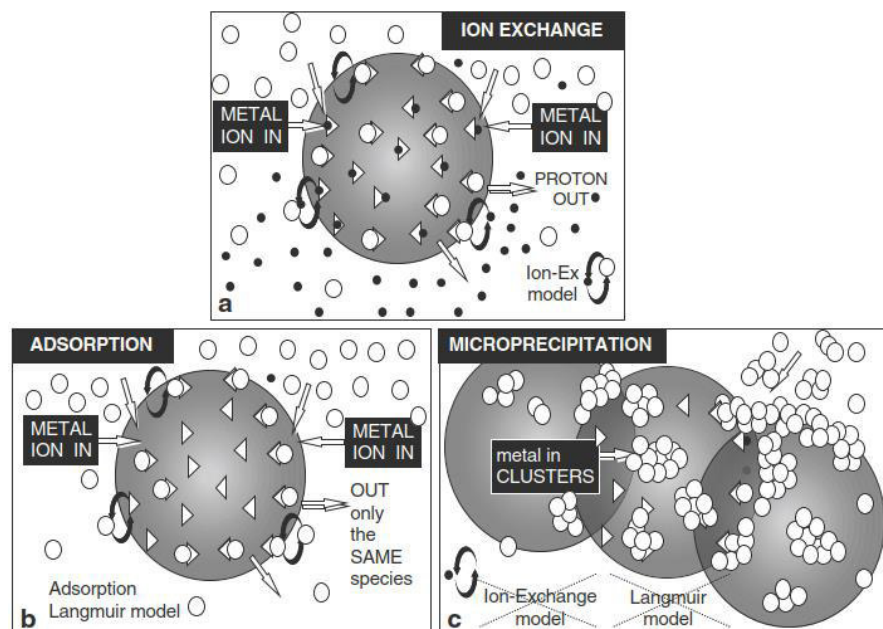


Figura 3: Representación gráfica de (a) principio de intercambio iónico, (b) principio de adsorción, y (c) principio de microprecipitación

Fuente. Kotrba, 2011

2.2.7 Biosorción de metales pesados

La definición de sorción hace alusión a un proceso fisicoquímico que ocurre entre dos sustancias. Incluye fenómenos de adsorción, como de absorción y se emplean para eliminar metales pesados (Gadd, 2008). La adsorción implica la unión de una molécula a una superficie, mientras que la absorción, implica que la molécula sea captada o internalizada (Fomina & Gadd, 2014).

La biosorción es mucho más económica que otras estrategias de eliminación de iones metálicos. La capacidad de una biomasa para recuperar los iones metálicos depende de varias propiedades físicas, químicas y biológicas. Los materiales naturales celulósicos comunes se emplean principalmente como adsorbentes potenciales para metales pesados. Cada organismo biosorbente tiene

especificidad por un ion metálico en particular. Se ve que ciertas sustancias poliméricas extracelulares (EPS), una mezcla compleja de polisacáridos, mucopolisacáridos y proteínas, son capaces de unir una cantidad significativa de iones metálicos tóxicos (Pratish et al., 2018). La biosorción es un proceso interactivo en el que los iones metálicos se unen de forma no específica a los polisacáridos y proteínas presentes en la superficie celular. Es una característica en la que tanto las células vivas como la biomasa microbiana muerta proporcionando sitios de unión (Tayang & Songachan, 2021).

La biosorción llevada a cabo por microorganismos, es una alternativa más amigable con el medio ambiente, que presenta la ventaja de ser, rápida, selectiva, barata y altamente disponible. Sin embargo, su aplicación a nivel industrial no se ha concretado efectivamente, debido a dos retos que se discuten a continuación.

Se han identificado algunos biomateriales potenciales con alta capacidad de unión a metales. Entre esos biosorbentes, hay algas marinas, bacterias, hongos, levadura y residuos microbianos. (Wang J & Chen C, 2006), se considera una biotecnología rentable para el tratamiento de aguas residuales complejas de alto volumen y baja concentración que contienen metales pesados. Entre los biosorbentes prometedores para la eliminación de metales pesados que se han investigado durante las últimas décadas, destaca *Saccharomyces cerevisiae* que se emplea en la producción de alimentos y bebidas, se cultiva fácilmente utilizando medios baratos, también es un subproducto en grandes cantidades como desecho de la industria de la fermentación.

La naturaleza de la pared celular determinará la eficiencia de la captación de los metales, por lo que deben considerarse los factores que influyan en sus características, como la especie, cepa de la levadura y la fase de crecimiento en la que se llevará a cabo el proceso de biosorción. Diversos estudios sobre la capacidad de biosorción de metales por *S. cerevisiae* y otros microorganismos, han determinado que, en la fase de crecimiento exponencial, hay mayores porcentajes de remoción de metales pesados (Moreno et al., 2018).

La edad celular de la biomasa también influye en la biosorción de metales. Por lo general, las células en la fase de adaptación o en las primeras etapas de crecimiento tienen una mayor capacidad de biosorción de iones metálicos que las de la fase estacionaria. Simmons y Singleton (1996) informaron la capacidad de absorción de Ag^+ por células más jóvenes (24 h de edad) en una cepa industrial de *S. cerevisiae* era casi el doble de las células más viejas (96 h de edad): 0.187 y 0.387 mmol Ag^+ /g de masa seca, respectivamente (Wang & Chen, 2016).

2.2.8 Mecanismo de biosorción

La biosorción se lleva a cabo por biomasa muerta o células vivas como captación pasiva a través de la formación de complejos superficiales en la pared celular y las capas superficiales. La bioacumulación depende de una variedad de mecanismos químicos, físicos y biológicos (ver figura 4) y estos factores son procesos intracelulares y extracelulares, donde la biosorción tiene una influencia limitada (Fomina & Gadd, 2014).

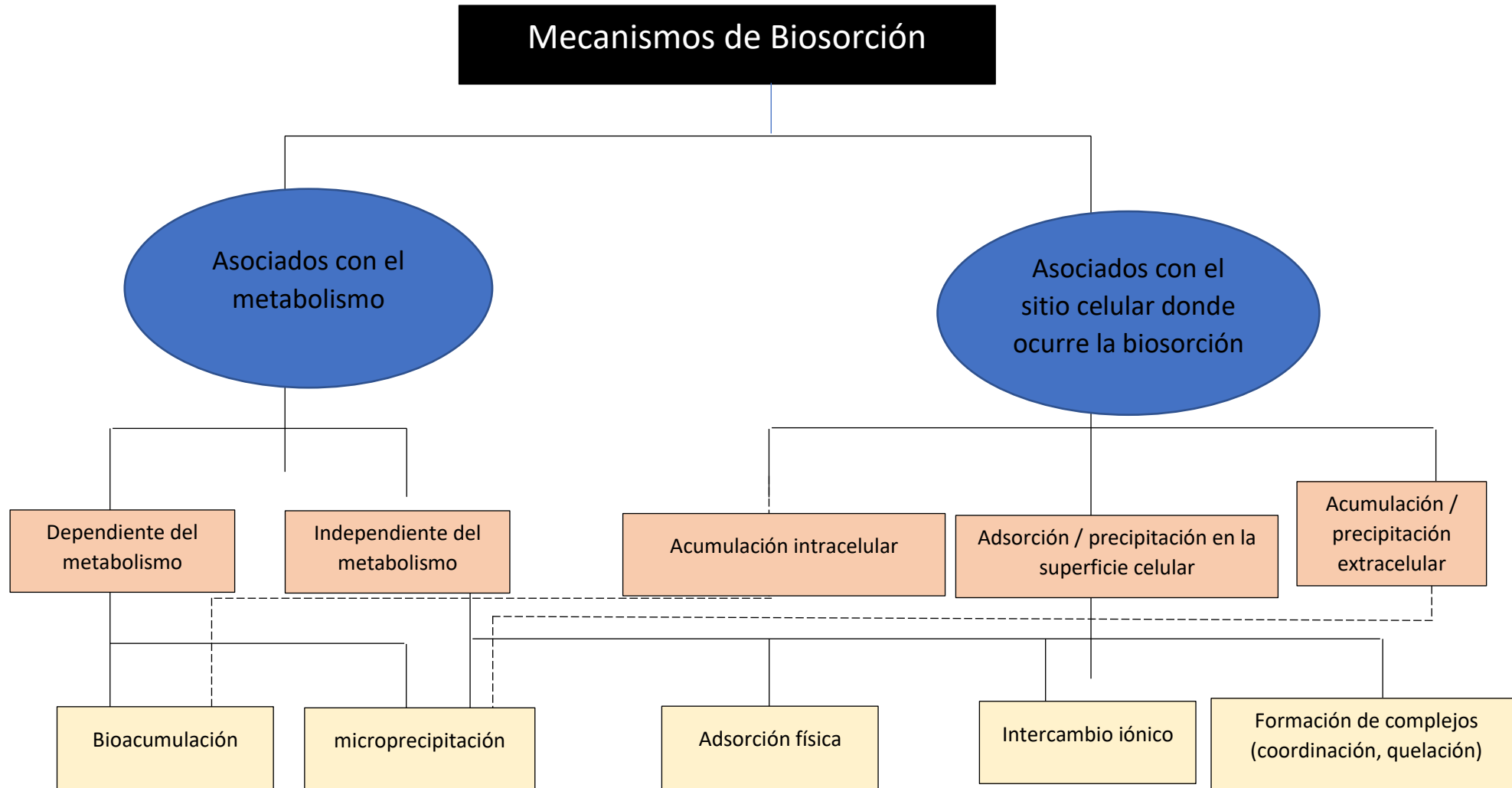


Figura 4: Clasificación de los procesos de biosorción con base en su asociación con el metabolismo y con el sitio donde ocurre la biosorción

Fuente. Moreno-Rivas et al., 2018

2.2.9 Isotermas de adsorción

Las isotermas de adsorción determinan las interacciones entre el adsorbato y la superficie del adsorbente durante un proceso de adsorción. La cantidad de adsorbato sorbido por unidad másica de adsorbente (llamado también carga: q_e) es calculado mediante ecuaciones particulares para cada modelo matemático existente para esta operación unitaria. Los modelos más empleados en la bibliografía de isotermas de fases sólido-líquido son: Langmuir, Freundlich, Hill, Redlich-Peterson y Temkin (Montalvo et al., 2022).

El modelo de isoterma de Langmuir se basa en que la adsorción se desarrolla en determinadas zonas homogéneas de la superficie del adsorbente (Langmuir, 1916). Dicho modelo es válido para adsorción monocapa en una superficie con un número finito de sitios de adsorción de igual energía (Kecili & Mustansar, 2018), y es expresado mediante la siguiente ecuación:

$$q_e = \frac{K_L C_e}{1 + q_{max} C_e}$$

Donde C_e es la concentración de adsorbato en el equilibrio (mg/L), q_e es la cantidad de adsorbato adsorbido por unidad de masa de sólido adsorbente (mg/g), q_{max} es la capacidad máxima de cobertura de la monocapa (mg/g) y K_L es la constante de adsorción de Langmuir relacionada con la energía de adsorción (L/mg). Las características esenciales de la isoterma de Langmuir se expresan mediante una constante adimensional llamada factor de separación R_L definida en la ecuación (Togue, 2019):

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0}$$

Dónde C_0 es la concentración inicial de adsorbato (mg/L). El valor de R_L denota que la naturaleza de la adsorción es favorable si $0 < R_L$ ó si es irreversible si $R_L = 0$ (ello ocurre si K_L es muy grande, lo que significa que el grado de adsorción es elevado), desfavorable si $R_L > 1$, lineal si $R_L = 1$.

El modelo de isoterma de Freundlich es aplicable a la adsorción no ideal y multicapa en fase gas-sólida sobre superficies heterogéneas con interacción entre las moléculas adsorbidas, definiéndose mediante la siguiente ecuación (Freundlich, 1926):

$$q_e = K_F C_e^{1/n}$$

Dónde q_e es la cantidad de adsorbato (contaminante) adsorbido por unidad de masa de adsorbente en el equilibrio (cáscara de arroz, mg/g), C_e es la concentración de solución de equilibrio del adsorbato (mg/L), K_F es la constante de adsorción de Freundlich (L/g) y n (adimensional) es la constante empírica que indica si la adsorción es lineal ($n = 1$), quimisorción ($n < 1$) o fisorción ($n > 1$).

2.2.10 Reino Fungi

A este grupo pertenecen los organismos eucarióticos filamentosos y algunos unicelulares. Los hongos son heterotróficos, saprobios o parásitos y la nutrición es por absorción.

Los grupos más importantes de los hongos son:

1. Ascomicetos: con hifas septadas, esporas llamadas ascosporas, habitan el suelo y material en descomposición. Ejemplo *Neurospora*, *Saccharomyces*.
2. Basidiomicetos: Hongos comúnmente llamados setas, con hifas septadas y esporas de tipo basidiosporas, habitan el suelo, material vegetal en descomposición. Ejemplo: *Agaricus*.

Constituye un grupo de organismos con tamaños muy diversos, de unicelulares microscópicos hasta pluricelulares. (Lazcano, 2014).

Los estudios e investigaciones ecológicas son frecuentemente realizados en porciones de la superficie del globo, ya sea en el agua o suelo, conocidos como ecosistemas, que puede tratarse de extensiones de agua como los mares, lagos, ríos, estanques, humedales, etc, denominados ecosistemas acuáticos. Estos son recursos que permiten la vida de los seres vivos incluyendo al hombre, motivo por el cual su mantenimiento, manejo y cuidado adecuado ayudará a que el recurso sea sostenible en el tiempo, con características químicas y biológicas que hagan posible la supervivencia de las especies que en él habitan (Lazcano, 2014).

2.2.11 Toxicidad por metales pesados en levaduras

Levadura: Son hongos unicelulares, vistos al microscopio aparecen como pequeñas células redondeadas u ovoides. La rapidez con que se multiplican se asemeja a las bacterias, pero en realidad, se trata de hongos microscópicos, de los que hay muchísimos géneros. La mayoría de las levaduras empleadas por el hombre pertenecen al género *Saccharomyces*. Las levaduras bioacumulan metales pesados eficientemente; las vías de entrada a la célula son las permeasas y canales de transporte localizados en la membrana plasmática, que el microorganismo emplea para captar metales esenciales como Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , así como SO_4^{2-} , PO_4^{2-} y algunos transportadores de glucosa y glicerol. El Cd^{2+} entra al citoplasma de las levaduras como *Saccharomyces*, a través de los canales proteicos que captan Zn^{2+} (Zrt1p), Mn^{2+} (Smf1p, Smf2p), Fe^{2+} (Fet4p) y Ca^{2+} (Mid1p); además, el Pb^{2+} se internaliza a través de los canales para el calcio (Wysocki et al., 2001).

En la investigación de Van der Heggen et al. (2010), los resultados presentados evidenciaron que la membrana plasmática no es el objetivo primario e inmediato de la toxicidad del Pb en *Saccharomyces cerevisiae*. La pérdida de actividad metabólica celular (evaluada por la capacidad de procesar FUN-1) es un indicador temprano de toxicidad por Pb. Un contacto más prolongado (2h) de las células de levadura con Pb genera una pérdida elevada (>50%) de la actividad metabólica y de la capacidad de proliferación de las células de levadura a través de un mecanismo que requiere la síntesis de proteínas.

La toxicidad de los metales pesados es la capacidad de un metal para causar efectos perjudiciales sobre los microorganismos y depende de la biodisponibilidad del metal pesado y de la dosis absorbida (Rasmussen et al., 2000). La toxicidad de los metales pesados involucra varios mecanismos, es decir, romper funciones enzimáticas, reaccionar como catalizadores redox en la producción de especies reactivas de oxígeno, destruir la regulación de iones y afectar directamente la formación de ADN y proteínas. Las propiedades fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos se modifican por el contenido de metales pesados (Igiri et al., 2018).

2.2.12 Detoxificación de metales en levaduras

Saccharomyces cerevisiae es usada como un organismo modelo para entender la muerte celular y sus mecanismos. La toxicidad inducida por metales está asociada a muerte celular a través de incremento intracelular de ROS y la pérdida de homeostasis en Ca^{2+} . ROS induce la disfunción mitocondrial (liberación del citocromo C desde el interior de la mitocondria al citoplasma), promoviendo así la activación de caspasas-9 y con ello la hidrólisis de proteínas específicas.

Por otro lado, la autofagia mantiene la homeostasis celular a través de la eliminación de orgánulos dañados y macromoléculas tóxicas y, por lo tanto, evita que el organismo sufra daños y enfermedades.

2.2.13 Metalotioneínas

Son proteínas queladoras de metales pesados, de bajo peso molecular que poseen cisteína y se encuentran en el citosol de las células eucariotas. Tienen la capacidad de ligarse a iones de metales como el Zn, Cu, Cd, Hg. (Lazcano, 2014)

2.2.14 Saccharomyces cerevisiae

Es una levadura inocua utilizada en la industria alimentaria; la obtención de su biomasa es un proceso ampliamente industrializado y económico, obteniéndose como subproducto de los procesos de fermentación (Farhan & Khadom, 2015).

Saccharomyces cerevisiae tiene la capacidad de remover metales pesados a bajas concentraciones, en soluciones acuosas, así como de tolerar cambios de pH y temperatura durante diferentes procesos (Rao & Prabhakar, 2011; Veglio & Beolchini, 1997; Wysocki et al., 2001). La *Saccharomyces cerevisiae* biosorbe una mayor cantidad de metales, entre ellos, Pb y Cr a temperaturas cercanas a 25°C; sin embargo, procesos a temperaturas mayores de 40°C generan daños a la superficie del biosorbente, disminuyendo su eficiencia de remoción (Dhankhar & Hooda, 2011).

2.2.15 *Candida guilliermondii*

Representa un organismo modelo para sobreproducción de riboflavina (RF, vitamina B2). Esta especie de levadura también es uno de los organismos más efectivos para la bioconversión de xilosa en xilitol, el edulcorante anticaries, e incluso es capaz de utilizar hidrolizados hemicelulósicos, obtenidos por hidrólisis ácida, como fuente de energía es una fuente abundante de enzimas, por ejemplo, inulinasa, así como biocombustibles y aromas. *C. guilliermondii* parece ser uno de los organismos más efectivos para la bioconversión de xilosa en xilitol. El xilitol es equivalente a la sacarosa en dulzura, mientras que es anticariogénico y metabolizado por una vía independiente de la insulina a diferencia de la sacarosa. Debido a que tiene un calor de solución negativo significativo, el xilitol es especialmente útil en mentas, dulces, gomas de mascar y pasta de dientes (Papon et al., 2013). Aunque el ácido cítrico se produce comercialmente por *Aspergillus niger*, se ha demostrado que especies de *Candida* son capaces de producir ácido cítrico a partir de glicerol o glucosa. En *Candida guilliermondii* se sintetiza ácido cítrico a partir de glicerol o glucosa. El aislamiento de cepas hiperproductoras de lisina a partir de una variedad de microorganismos se ha explorado para su posible uso durante la fermentación a gran escala de lisina (West, 2016).

2.3 Términos Conceptuales - Glosario

- **Adsorbente:** Los adsorbentes poseen propiedades secuestrantes de metales capaces de disminuir rápida y eficientemente la concentración de

iones metálicos en una solución compleja diluida (Wang & Cheng, 2006). Por razones económicas, los investigadores han enfatizado el análisis de varios subproductos de las industrias de fermentación porque están disponibles en grandes cantidades. Uno de esos residuos de la industria de alimentos y bebidas es la biomasa de residuos de cervecería *Saccharomyces cerevisiae*. Durante la fermentación, la biomasa de levadura aumenta de tres a seis veces; sin embargo, este material de desecho de la cervecería se utiliza principalmente como alimento para cerdos y rumiantes (Soares & Soares, 2012). Los biosorbentes pueden ser tratados por varios procesos químicos o físicos para mejorar la efectividad de sus grupos funcionales, aumentando así las capacidades de unión de metales (Oke et al., 2017).

- **Adsorción:** La adsorción de iones tiene lugar sobre materiales altamente porosos (adsorbente), como: carbón activo, óxidos de hierro y aluminio, arcilla, materiales sintéticos y otros substratos de origen biológico. En este proceso la sustancia adsorbida se une a la superficie del adsorbente mediante fuerzas físicas (fuerzas de Van der Waals) que son enlaces débiles lo que lo hace un proceso reversible por otro tipo de fuerzas químicas o enlaces covalentes (Patterson, 1991; Maldonado, 2007).
- **Agua subterránea:** Es el agua existente bajo la superficie del terreno. En concreto, es aquella situada bajo el nivel freático y que está saturando completamente los poros y fisuras del terreno.
- **Agua superficial:** Es la proveniente de las precipitaciones, que no se infiltra ni regresa a la atmósfera por evaporación o la que proviene de manantiales o nacimientos que se originan de las aguas subterráneas.
- **Biomasa:** En este estudio el término biomasa comprende el conjunto de microorganismos en el ecosistema acuático, particularmente las levaduras; esta biomasa puede ser activa (viva) o inactiva (muerta). La biomasa microbiana es una variable ecológica importante; ya que se

puede expresar como la medición de la cantidad de levaduras en un volumen específico de agua.

- **Biorremediación:** Se define como el proceso de eliminación de contaminantes de un lugar contaminado mediante el uso de sistemas microbianos. Los microorganismos utilizan los contaminantes como alimento y fuente de energía, descomponiéndolos en uno menos tóxico. El objetivo principal de la biorremediación es estimular la microflora nativa del lugar contaminado al proporcionar más alimentos y condiciones de crecimiento adecuadas para que crezcan sin ningún inconveniente y producir más enzimas como metabolitos secundarios. Durante el proceso de biorremediación del contaminante, los enlaces químicos se rompen y se libera energía, que luego es empleada por los microorganismos para su crecimiento (Azubuike et al.,2016). La biorremediación se emplea para transformar los metales pesados tóxicos en un estado menos dañino utilizando microbios o sus enzimas para limpiar el medio ambiente contaminado (Igiri et al., 2018).
- **Coloraciones gram:** Tinción diferencial de las bacterias debido a la constitución química de la pared celular. Aquellas que toman el color azul del cristal violeta y no se decoloran con el alcohol acetona, se denominan Gram positivas (+) y las que se decoloran y toman el color de contraste de la fucsina básica (rojo grosella), se denominan Gram negativas (-) (Lazcano, 2014)
- **Humedal:** Los humedales son: “Las extensiones de marismas (marinas), pantanos y turberas, o superficies cubiertas de agua, sean estas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda seis metros; podrán comprender zonas ribereñas o costeras adyacentes, así como las islas”. (Convención Relativa a los Humedales de Importancia Internacional o Convención Ramsar, Irán 1971).

- **ICP-MS:** (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente) es una técnica de análisis inorgánico elemental e isotópico capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en un rango dinámico lineal de 6 órdenes de magnitud (ng/L – mg/L) además de poder llevar a cabo la determinación de los elementos en un análisis multielemental que provee la composición de la muestra analizada.
- **Metales pesados:** Los vertidos industriales, sobre todo, pueden aportar al agua metales como Cd, Hg, Zn y otros, cuya presencia reduce la aplicabilidad para riego de las aguas residuales por sus efectos tóxicos para los cultivos y la salud. (Lazcano, 2014).
- **Piezómetro:** Es una tubería de diámetro pequeño, abierta en ambos extremos. Se utiliza para medir el nivel de agua y para toma de muestras de agua subterránea.
- **Sorción:** Es un proceso fisicoquímico que ocurre entre dos sustancias. Incluye fenómenos de adsorción y absorción. La adsorción es la unión de una molécula a una superficie, mientras que la absorción, se refiere a que la molécula sea captada o internalizada. El añadir el término “bio” a la palabra sorción, involucra el hecho de que se usarán compuestos de origen biológico, como sorbentes. Su objetivo es disminuir la concentración de un sorbato (ej. metal pesado), en el medio aplicado. Los procesos de sorción en un material biológico son más complejos, ya que además de adsorción y absorción, involucran intercambio iónico, precipitación y acomplejamiento químico (Moreno et al., 2018).

CAPITULO 3 METODOLOGIA

3.1 Tipo y diseño de investigación

El tipo de investigación es aplicada y el diseño es experimental. La colección de datos se realizó mediante la observación directa y con la ayuda de instrumentos de medición. Es experimental por que se manipularan variables independientes para ver su efecto en las dependientes. Investigación de tipo experimental.

3.2 Unidad de los análisis

La unidad de análisis en este estudio es el conjunto de microorganismos levadura (biomasa) aislados de los sectores - cuerpos de agua - del ACR Humedales de Ventanilla que tienen la mayor concentración de contaminante Pb disuelto en dicho ecosistema y cada uno de los tipos de levadura empleadas en las matrices de optimización. Esta unidad de análisis fue aplicada en forma de microorganismos activos (vivos), inactivados y muertos en procesos de reacción, y su efecto en la remoción de Pb fue evaluado. A partir de ello se optimizará las condiciones de la biomasa para una eficiente remoción de Pb en presencia de Cd.

3.3 Población de estudios

La población de estudio es un subconjunto del ecosistema marino microbial presente en el ACR Humedales de Ventanilla.

Tal como fue mencionado en el Item Unidad de análisis, la población de estudio se limitará a los hongos levaduriformes (levaduras) aisladas de los cuerpos de

agua superficial y agua subterránea (piezómetro) con contenido elevado de contaminante Pb en el Area de Conservación Regional Humedales de Ventanilla.

3.4 Tamaño de muestra

Muestras de agua superficial (250ml) y agua subterránea (250 ml) procedentes de los cuerpos de agua y piezómetro más afectados por Pb del Area de Conservación Regional Humedales de Ventanilla para el aislamiento de las levaduras nativas.

La muestra está representada por los inóculos obtenidos de la propagación de las cepas de levadura con mayor crecimiento y tolerancia al metal Pb.

3.5 Selección de muestra

Para la selección de las muestras se realizó un levantamiento de línea base de los valores de Pb disuelto en los cuerpos de agua del ACR Humedales de Ventanilla.

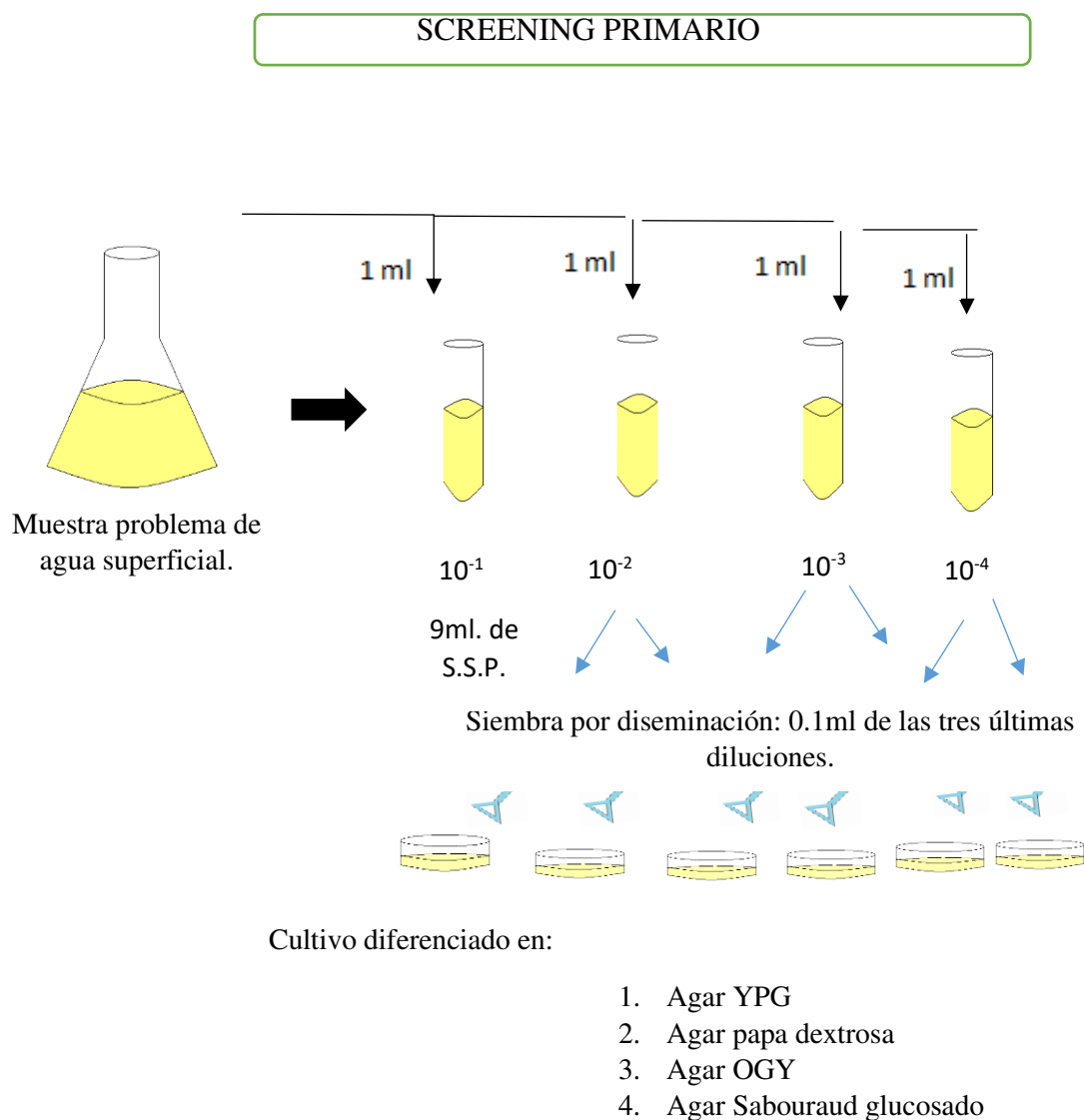
Se colectaron muestras de aguas en diecisiete estaciones de muestreo con el fin de realizar la caracterización química de los metales pesados más críticos (Pb y Cd) durante las tres épocas de monitoreo (agosto 2019, febrero 2020 y agosto 2020). Las 17 estaciones de muestreo fueron las establecidas en el año 2015. De las 17 estaciones de muestreo 15 fueron de agua superficial y 2 fueron de agua subterránea (M-16 y M-17), las muestras de agua subterránea se tomaron de piezómetros construidos en el año 2015 y que tuvieron mantenimiento y limpieza en los años 2019, 2020, 2021 y 2022. En el muestreo del año 2021 y 2022 las 6 estaciones de muestreo seleccionadas fueron (M-17, M-10, M-4, M-5, M-1 y M-15) que se denominaron para los estudios microbiológicos como J-1, J-2, J-3, J-4, J-5 y J-6, las muestras colectadas fueron sembradas en matraces de 250 ml con 100 ml caldo YPG para el aislamiento de microorganismos tolerantes a metales pesados.

3.6 Recolección

Se colectaron muestras simples en las estaciones de muestreo. La cantidad de muestra fue 250 ml de agua, en envases de plástico nuevos, rotulados adecuadamente, se adicionó el preservante ácido nítrico hasta $\text{pH} < 2$ para metales totales y las muestras fueron congeladas inmediatamente. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de análisis ambiental Servicios Analíticos Generales (firma acreditada por el INDECOPI-Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual), donde se analizaron los metales presentes en muestras por ICP-masas y en la 6 estaciones de muestreo seleccionadas para los aislamientos de microorganismos (J-1, J-2, J-3, J-4, J-5 y J-6) se tomaron muestras en frascos estériles de vidrio de 250 ml para los aislamientos microbiológicos en laboratorio y muestras en frascos de plástico para los metales totales, también se midió en campo pH, temperatura, conductividad y oxígeno disuelto a fin de caracterizar mejor las fuentes de aislamiento de los microorganismos.

3.7 Aislamiento de Microorganismos

Se realizó un aislamiento primario, tal como se ilustra en la Figura 5, a fin de determinar que microorganismos estaban presentes en el ACR Humedales de Ventanilla y para ajustar el protocolo de aislamiento de levaduras (Figura 6).



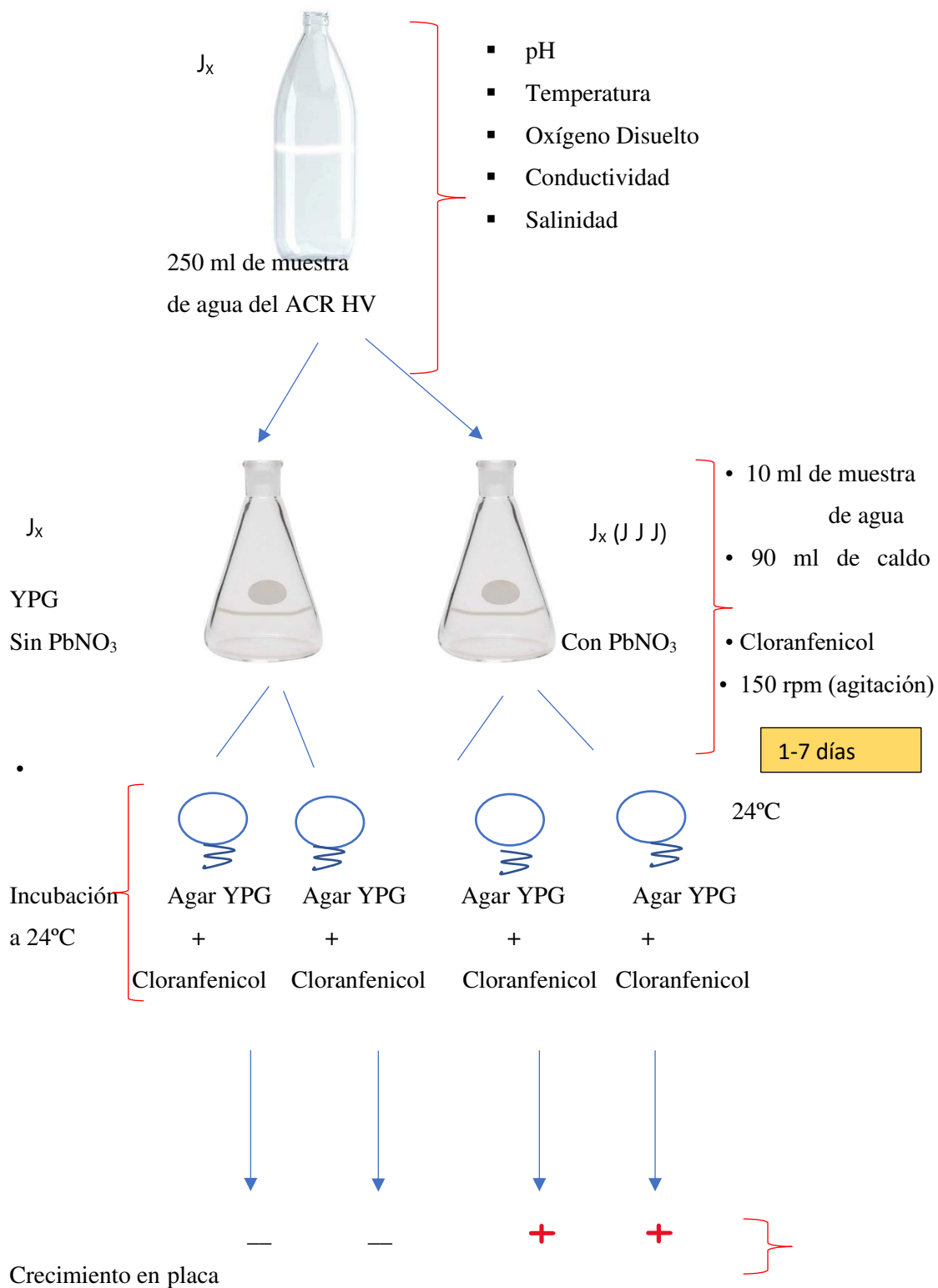
Incubación a 25 – 30°C por 24 a 48 horas.

Se seleccionó colonias típicas de levaduras y actinomicetos aislados, pruebas de identificación (coloración gram) y se pasaron a ceparios las levaduras para pruebas posteriores.

Figura 5: Esquema de Screening primario de microorganismos presentes en el ACR Humedales de Ventanilla que permitió ajustar el segundo protocolo de la Figura 6.

3.8 Aislamiento de levadura y selección de levaduras

El aislamiento se realizó en caldo YPG (5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de peptona de carne, 20 g/L de glucosa, 18 g/L de agar con 0.02% de cloranfenicol a pH 5.5). Los ingredientes para formular los medios de cultivo de las levadura fueron de Himedia, el resto de los reactivos usados en el estudio se obtuvieron de Sigma Aldrich; el sistema de aislamiento fue en matraces de 250 ml de capacidad, con 100 ml de caldo YPG a 150 rpm de agitación y a 24 grados centígrados, se preparó 2 matraces por estación de muestreo, 6 matraces denominados (J-1, J-2, J-3, J-4, J-5 y J-6) y los 6 matraces con caldo YPG complementados con 0.4 mg/L de Pb a partir de la sal nitrato de Pb de la marca Sigma Aldrich, estos sistemas se denominaron (J1- JJJ, J2- JJJ, J3- JJ, J4- JJJ, J5- JJJ y J6- JJJ), de los 12 matraces del protocolo se sembraron por diseminación con espátula drigalski 0.1 ml de caldo de proceso en placas Petri con agar YPG. El procedimiento de sembrado en placa se realizó a las 24, 48, 72, 96 y 120 h de proceso, los matraces con las muestras se mantuvieron en agitación constante. Las colonias sospechosas y de interés fueron aisladas en caldo YPG a pH 5.5 para luego generar cultivos puros, también se realizaron coloraciones gram. Entre los microorganismos aislados se identificó 9 levaduras.



Esquema de aislamiento de levaduras procedentes del ACR Humedales de Ventanilla

3.9 Identificación de microorganismos

Se identificaron 9 levaduras del humedal con morfología típicas observadas en la coloración gram de los extendidos de las colonias puras y se identificaron bioquímicamente por Kit API ID 32C de la marca Biomérieux, tal como se describe en la Figura 7. Este kit es un sistema estandarizado para la identificación de levaduras compuesta por 32 ensayos de asimilación miniaturizados, la identificación se obtuvo con la ayuda de un programa informático de identificación, las levaduras identificadas fueron *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus humicola* y *Rhodotorula mucilaginosa* (ver Tabla 5), las levaduras fueron sembradas en tubos con caldo YPG a concentraciones de 1, 5, 10 y 1000 mg/L de Pb y se incubaron a 24°C durante 1 semana, cada día se realizaban lecturas a fin de determinar si había crecimiento o inhibición (ver tabla 6). Las levaduras identificadas se pasaron a cerapio en crioviales con caldo YPG suplementado con glicerol al 10% y se conservaron a -20°C.

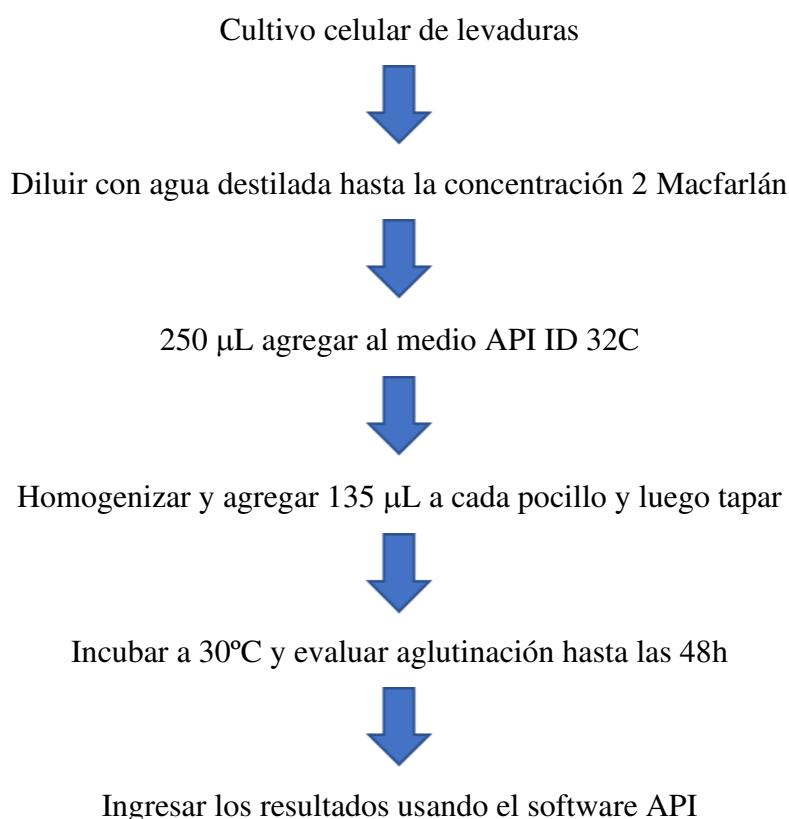


Figura 7: Esquema de identificación bioquímica con Kit API 32

Fuente. Elaborado a partir de manual de la empresa Biomérieux ID 32C

3.10 Análisis de metales totales

3.10.1 Análisis de metales totales en levadura activa

La concentración de metales se analizó mediante la técnica de ICP (Inducción de Plasma Acoplado).

Para los análisis por ICP- masas de las muestras procedentes de los matraces del diseño experimental levadura activa más eficiente en remoción de Pb se compararon a *Candida guilliermondii* (aislada del piezómetro del humedal) y *Saccharomyces cerevisiae* (cepa comercial patrón); se tomó alícuotas de 10 ml en tubos Falcon de 15 ml, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes fueron analizados para evaluar el porcentaje de remoción de Pb en 6 intervalos de tiempo, los matraces iniciaron con 1mg/L de Pb en caldo YPG a pH 5 y 6 , los tiempos de muestreo fueron a las 3h, 7h, 11h, 24 h, 48h y 72h, los matraces estuvieron en un sistema de 150 rpm en un shaker incubador serie TOU-50/120 (MRC Laboratory Instruments, Holon, Israel) a 30°C. Los resultados de remoción de las levaduras activas se observan en la Figura 13 para la levadura nativa *Candida guilliermondii* y Figura 14 para la levadura comercial panadera *Saccharomyces cerevisiae*.

3.10.2 Análisis de metales totales en levadura inactivada y muerta

Para la biosorción como levaduras inactivadas y muertas se trabajó con 1 gramo de levadura a diferentes tratamientos térmicos 45°C (inactivada) y 121°C (muerta), el secado posterior a la centrifugación de las biomasa generadas durante 48 h en caldo YPG y su respectivo lavado con agua destilada estéril y segunda centrifugación, se realizó un secado en estufa modelo UF110 (Memmert GmbH, Schwabach, Alemania) a 45°C durante 24 h para todos los tratamientos; de la biomasa generada en caldo YPG durante 48 h de crecimiento para ambas levaduras, en el tratamiento térmico a 121°C durante 30 min en autoclave, se centrifugó la biomasa en tubos Falcon de 50 ml a 2600 rpm durante 10 min, los sobrenadantes se eliminaron y se suspendieron los sedimentos en agua destilada estéril para proceder a una segunda centrifugación como lavado, el sobrenadante se eliminó y los sedimentos ya

lavados se secaron a 45°C en estufa durante 24 h. Para el sistema de biosorción de Pb en presencia de Cd se trabajó con 1 g de levadura inactivada en matraces de 250 ml con 100 ml de agua desionizada a pH 6 con una concentración inicial de Pb que fue de 3.2814 mg/L y para el Cd 0.17135 mg/L, se tomaron muestras de 10 ml en tubos falcón de 15 ml en los tiempos de 1, 3, 24 y 48 h, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se analizó por ICP-masas.

3.11 Matrices de Optimización: Empleadas para determinar la eficiencia en remoción de Pb de la levadura nativa *Candida guilliermondii* en comparación con otras levaduras:

3.11.1 Matriz experimental 1: En esta matriz se trabajó con la levadura *Candida guilliermondii* (Levadura nativa con mayor potencial del ACR Humedales de Ventanilla) y con la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* aislada de su presentación comercial, ambas levaduras se cultivaron en agar YPG. Como etapa previa cada levadura se sembró en agar YPG a concentración inicial 0,1 / 0,2 / 0,4 / 0,6 ion Pb / litro, también se determinó su tolerancia en caldo YPG a concentraciones de 1,5,10 ion Pb/litro determinándose la concentración mínima inhibitoria (MIC) en 1 ion Pb / litro, importante para determinar límites de concentración para operación de microorganismo activo (Dutta, 2015). Considerando los valores de Pb en agua del ACR Humedales de Ventanilla se seleccionó el valor de 1 ión Pb/litro como concentración de trabajo en la matriz experimental 1.

La matriz experimental 1 se desarrolló para determinar el tipo de levadura activa más eficiente en cultivo standard YPG glucosa-levadura- peptona (Saitoh et al, 2020), las condiciones de operación en el shaker incubador fueron a 30 °C / 150 rpm para suspensión en caldo YPG con $[Pb]_0 = 1$ mg/l en un tiempo máximo de evaluación de 72 horas y se evaluó el proceso a pH 5 y pH 6 (Moreno, 2018), ingresaron al shaker incubador 12 matraces de 250 ml con 100 ml de caldo YPG y con una concentración de Pb inicial de 1 mg/L. La concentración de los inóculos fue muy cercana para ambas levaduras.

3.11.1.1 Evaluación de la remoción de Pb en presencia de Cd como levaduras inactivadas y muertas en agua desionizada a pH 6: También se

compararon las tendencias de remoción del sistema (Pb y Cd) como levaduras inactivadas a 45°C y como levaduras muertas a 121°C. La concentración inicial de Pb fue 3.2814 mg/L y para el Cd 0.17135 mg/L en matraces con agua desionizada a pH 6, el peso de levadura inactivada fue 1 g.

Para la inactivación se generó biomasa de ambas levaduras por separado en caldo YPG a pH 6 a las 48 h de crecimiento en caldo YPG se procedió a centrifugar en tubos Falcon de 50 ml a 2600 rpm durante 10 minutos, los sobrenadantes se eliminaron y se suspendieron los sedimentos en agua destilada estéril para proceder a una segunda centrifugación como lavado, el sobrenadante se eliminó y los sedimentos ya lavados se secaron a 45°C para levaduras inactivadas y para las levaduras muertas la biomasa generada en caldo YPG se autoclavo a 121°C luego se procedió a las dos centrifugaciones, lavados y al secado a 45°C en estufa durante 24 h. Las levaduras inactivadas y muertas se molieron y se tamizaron con malla U.S MESH número 35 de 0.5 mm generando granulometría D50 (50% de pasante y 50% de retenido).

3.11.1.2 Evaluación de la remoción de Pb en presencia de Cd con levadura residual cervecera:

Se evaluó la biomasa muerta a 80°C de levadura cervecera residual proporcionada por una planta cervecera de Lima, la cual fue centrifugada y lavada con agua destilada, el sedimento obtenido se secó a 45°C, se molieron y se tamizaron con malla U.S MESH número 35 de 0.5 mm generando granulometría D50 (50% de pasante y 50% de retenido).

3.11.1.3 Evaluación de la remoción de Pb en presencia de Cd con matriz estructural de levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* con tierra de diatomea:

La matriz estructural (50% de levadura instantánea panadera comercial *Saccharomyces cerevisiae* con 50% de tierra de diatomea) muertas a 100°C, se tamizaron con malla U.S MESH número 35 de 0.5 mm generando granulometría D50 (50% de pasante y 50% de retenido).

3.11.2 Matriz experimental 2: Diseño experimental con biomasa de levadura muerta - determinación de un modelo multivariable predictivo para la variable de respuesta porcentaje de Pb removido en presencia de Cd:

El modelamiento de la matriz 2 del diseño central compuesto (CCD) se realizó en la matriz estructural compuesta por 50% de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa comercial - referencial) con 50% de tierra de diatomea (soporte de sílice) porque presento los mejores resultados de remoción en Pb en la primera hora de contacto comparándola con las otras levaduras (*Candida guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, levadura residual cervecera).

Para la matriz experimental 2 se trabajó con diferentes granulometrías de la matriz estructural (50% de levadura *Saccharomyces cerevisiae* instantánea con 50% de tierra de diatomea) y con concentraciones de Pb y Cd en agua desionizada a pH 6. El rango de concentraciones iniciales estuvo entre 3 a 10 mg/litro de Pb y en el rango de 0.10 hasta 0.80 mg/ litro de Cd.

Se trabajaron con granulometrías de tratamiento térmico de secado a 100 °C durante 24 h con tamaños medio de partícula: D50 = 0.85 mm para malla 20, D50 = 1 mm para malla 18, D50 = 1.7 mm para malla 12, D50 = 2 mm para malla 10, D50 = 2.36 mm para malla 8.

En el Diseño central compuesto (CCD) con 3 puntos centrales y 2 réplicas por tratamiento se dividió en 2 bloques de 17 matraces por la restricción en capacidad de agitador-incubador TOU-120) cada matraz de 250 ml ingreso con 100 ml de agua desionizada con Pb y Cd a pH 6 a una temperatura de 30 °C, la concentración fija de biomasa inactiva fue de 5 gMS/l (De Rossi, 2018), a 150 rpm (Zhang, 2018) se tomaron alícuotas de 10 ml a 1 h, 2 h, 4 h y 7 h para posterior análisis de fases líquida por ICP- masas.

3.11.3 Matriz experimental 3/ Prueba de Optimización con biomasa de levaduras muertas en agua del ACR-HV para la remoción de Pb con presencia de Cd a las condiciones óptimas:

En esta matriz experimental se trabajó con 3 matrices estructurales de levaduras: (1) La levadura residual, se obtuvo de una corporación industrial de fermentación de cervecería ubicada en Lima. La levadura de desecho tratada a 80°C se centrifugó y lavó con agua destilada dos veces con una centrifugación

a 2600 rpm durante 5 minutos, el sedimento se secó a 100 °C en un horno durante 24 h. La levadura seca se tamizó en tamiz de malla N°18 con un tamaño de partícula 1 mm; (2) La matriz estructural (50% de levadura instantánea *Saccharomyces cerevisiae* con 50% de tierra de diatomea tratada térmicamente a 100°C) y con granulometría de 1 mm y (3) la levadura nativa del ACR-HV *Candida guilliermondii* muerta a 121°C, secada a 100°C y con granulometría de 1mm; las 3 matrices estructurales de levaduras fueron evaluadas a pH 6, temperatura de 30°C y con concentración de Pb inicial 0.0034 mg/L y concentración inicial de Cd de 0.00035 mg/L

3.11.4 Matriz experimental 4: Modelamiento con biomasa de levadura muerta para determinar un modelo ajustado según Langmuir/Freundlich:

Se realizó con biomasa muerta de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida guilliermondii* para la determinación del modelo que representa el proceso de remoción. Se desarrollaron 3 réplicas de cada sistema evaluado con 100 ml suspensión ACR -HV regulado a concentraciones de Pb = 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 1.0 mg/L respectivamente y a concentraciones de Cd = 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 y 0.1 mg/L respectivamente, con biomasa muerta granulada, a 30°C (Dutta, 2015 y Zhang, 2018) y 150 rpm durante 4 h, se tomaron 10 ml de muestra de cada matraz, se centrifugaron, la fase líquida se analizó por ICP-masas y la fase sólida se pesó con la finalidad de determinar el peso del bioadsorbente recuperado.

3.12 Tratamiento de los datos

Para evaluar los resultados de cada una de las estaciones de muestreo se generaron tablas con los valores obtenidos en cada monitoreo ambiental. Los valores de Pb en agua se observan en la Tabla 1 y los valores de Cd (segundo metal crítico del ACR-HV) en la Tabla 2.

Las levaduras identificadas por Kit API ID 32C se presentaron en la Tabla 5: aquí se precisa también la estación de muestreo de donde se aislaron las levaduras y el caldo de cultivo empleado.

Las levaduras identificadas y sus tolerancias a las diferentes concentraciones de Pb se muestran en Tablas 6 – 8, en ellas colocó el signo +, ++ y +++ según

el grado de turbidez observado en tubos con caldo YPG con diferentes concentraciones de Pb.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de las muestras de agua mostró valores por encima del límite máximo permisible para la conservación de ambientes acuáticos en algunas de las estaciones de muestreo (ver Tabla 1 y 2). Los valores de Pb del ACR-HV sobrepasaron o estuvieron cercanos a los estándares nacionales de calidad ambiental para el agua en el Perú (ECA agua 2017), según norma establecida por el Ministerio del Ambiente, según normativa peruana para aguas destinadas a la conservación del medio ambiente acuático (lagos - lagunas), los valores encontrados estuvieron por encima de los estándares (los límites son: Pb (estándar 0.0025 mg/L) y Cd (estándar de 0.00025 mg/L). El Pb se reportó como el metal pesado más crítico, seguido del Cd.

El metal pesado crítico en el ecosistema ACR Humedales de Ventanilla fue el Pb (con una concentración de hasta 0.3644 mg/L en la estación M-10), también fue representativa la problemática por Cd se reportó 0.01105 mg/L en la estación M-10 (J2)); el piezómetro M-17 (J1) también presento valores altos de Pb y fue la estación de muestreo de la que se aisló a *Candida guilliermondii* (cepa J1-JJJ).

En la Figura 8 se ilustró la secuencia de trabajo en campo y en la Figura 9 se ilustra la ubicación de las 17 estaciones de muestreo en el ACR Humedales de Ventanilla: 15 estaciones de agua superficial y 2 de agua subterránea (piezómetros).

En la Figura 10 se describieron las isolíneas de Pb obtenidas con los datos de campo y adicionalmente en la figura 11 las isolíneas de Cd, y en la Figura 12 se ilustra los histogramas de los valores de Pb.

4.1 Resultados de la fase de campo:

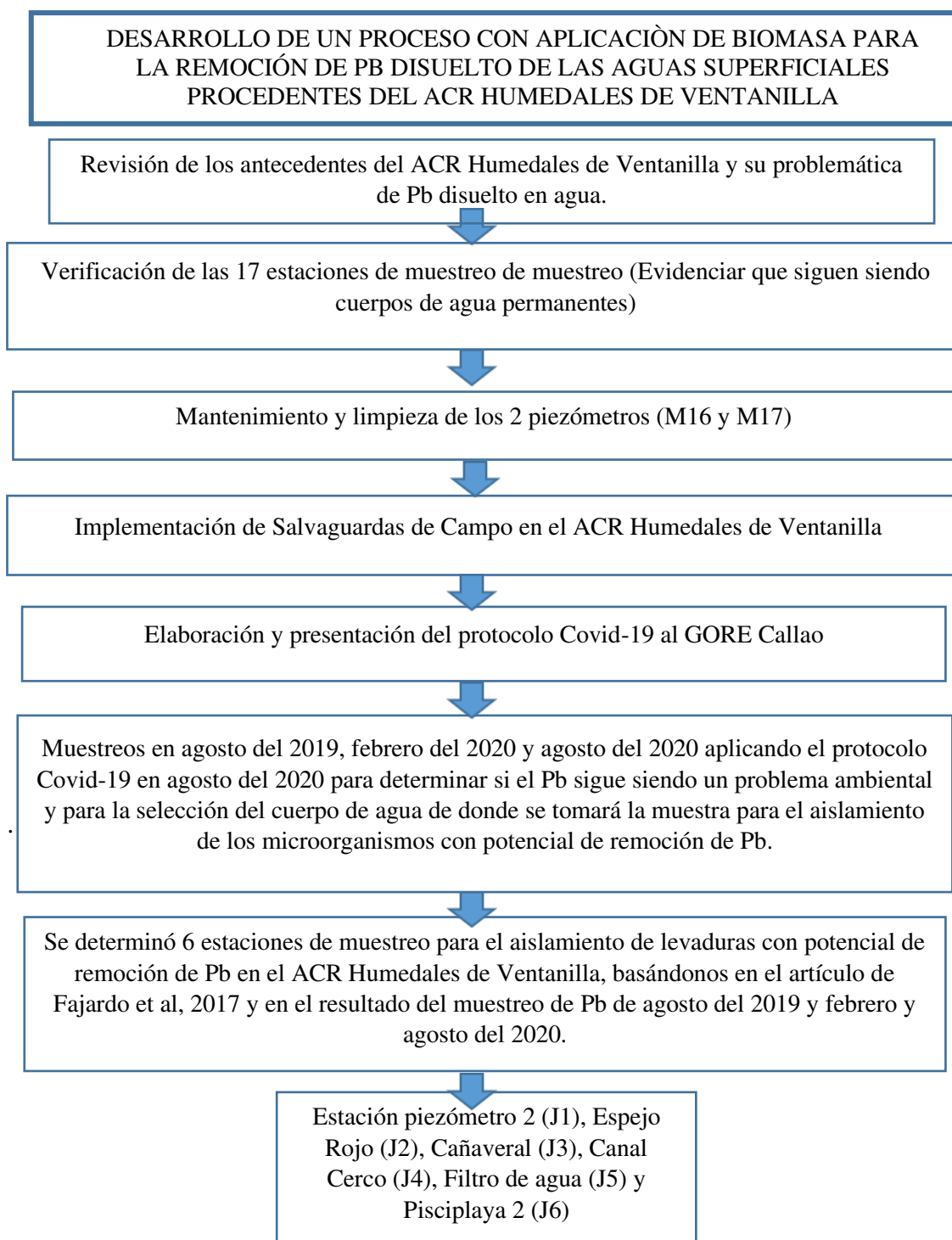


Figura 8: Esquema de trabajo en campo

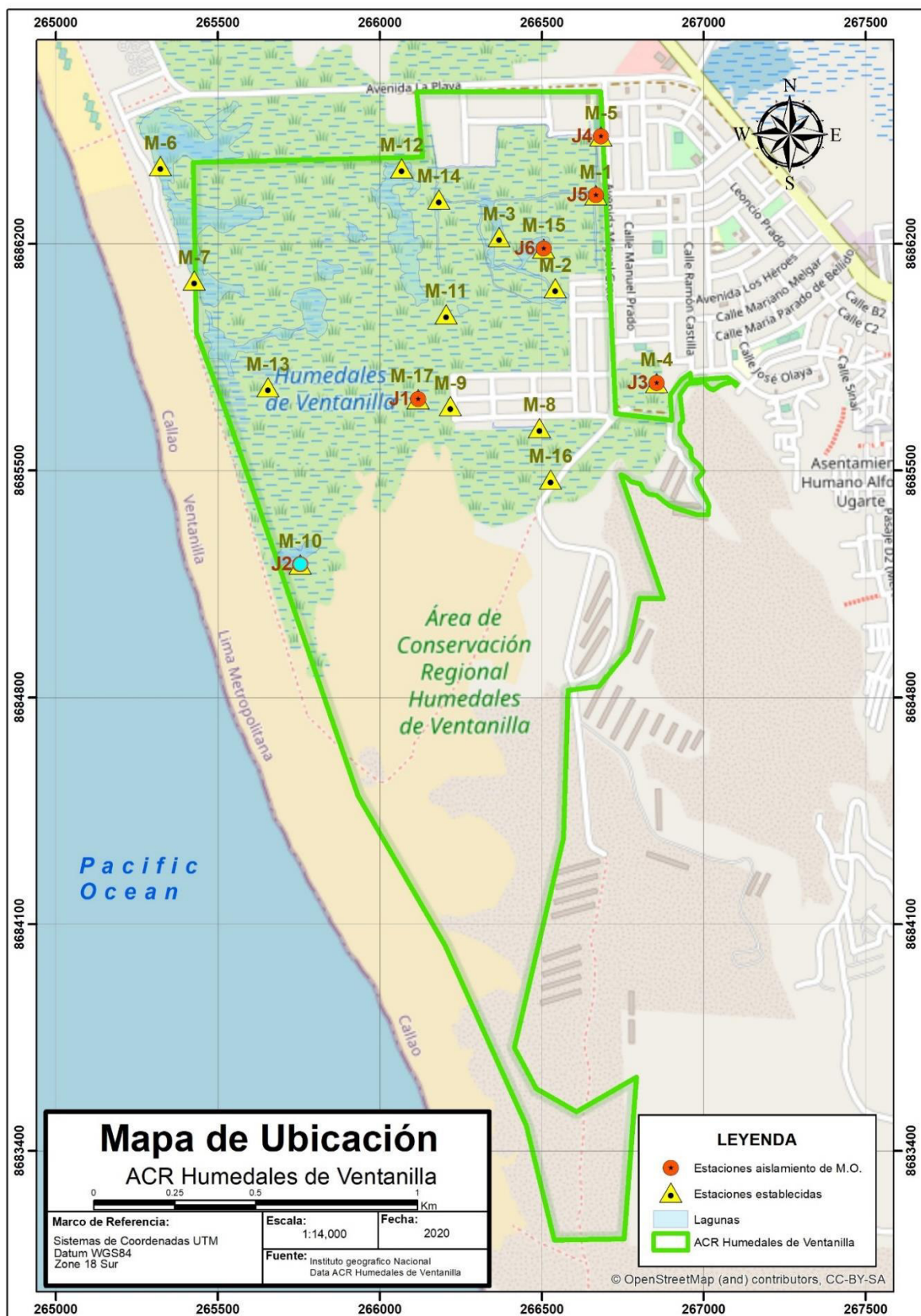


Figura 9: Ubicación de estaciones de muestreo en el Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla

Tabla 1: Concentración de Pb (mg/L) en cuerpos de agua en el Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla durante los años 2019 y 2020.

Número de estación	Nombre de estación	Pb Agosto 2019	Pb Febrero 2020	Pb Agosto 2020	Pb ECA 2017 Normativa Peruana
M-1	Filtro de agua	0.0003	0.0030	0.0661	0.0025
M-2	Valle Verde	0.0002	0.0003	0.0006	0.0025
M-3	Pisciplaya 1	0.0010	0.0004	0.0005	0.0025
M-4	Cañaverall	0.0067	0.0007	0.0124	0.0025
M-5	Canal Cerco	0.0067	0.0121	0.0104	0.0025
M-6	Boulevard Costa Azul	0.0002	0.0144	0.0011	0.0025
M-7	Playa Costa Azul	0.0003	0.0009	0.0002	0.0025
M-8	Canal Valle Verde 5D 1	0.0092	0.0031	0.0022	0.0025
M-9	Canal Valle Verde 5D 2	0.0083	0.0275	0.0005	0.0025
M-10	Espejo Rojo	0.0007	0.0149	0.3644	0.0025
M-11	Espejo Central	0.0007	0.0006	0.0007	0.0025
M-12	Espejo de Agua	0.0013	0.0029	0.0016	0.0025
M-13	Transecto 4 de aves	0.0111	0.0052	0.0023	0.0025
M-14	Canal 3	0.0008	0.0003	0.0006	0.0025
M-15	Pisciplaya 2	0.0003	0.0002	0.0003	0.0025
M-16	Piezómetro 1	0.0053	0.0039	0.0035	0.0025
M-17	Piezómetro 2	0.0141	0.0333	0.0262	0.0025

La estación de muestreo en la que se detectó valores muy elevados de Pb fue la M-17 que es una estación de agua subterránea.

Tabla 2: Concentración de Cd (mg/L) en cuerpos de agua en el Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla durante los años 2019 y 2020.

Número de estación	Nombre de estación	Cd agosto 2019	Cd febrero 2020	Cd agosto 2020	Cd ECA 2017 Normativa Peruana
M-1	Filtro de agua	0.00049	0.00100	0.00244	0.00025
M-2	Valle Verde	0.00013	0.00019	0.00013	0.00025
M-3	Pisciplaya 1	0.00026	0.00038	0.00030	0.00025
M-4	Cañaverall	0.00010	0.00007	0.00143	0.00025
M-5	Canal Cerco	0.00008	0.00012	0.00013	0.00025
M-6	Boulevard Costa Azul	<0.00003	0.00014	0.00008	0.00025
M-7	Playa Costa Azul	<0.00003	<0.00002	<0.00002	0.00025
M-8	Canal Valle Verde 5D 1	0.00832	0.00115	0.00182	0.00025
M-9	Canal Valle Verde 5D 2	0.00050	0.00101	0.00027	0.00025
M-10	Espejo Rojo	<0.00003	0.00056	0.01105	0.00025
M-11	Espejo Central	0.00014	0.00004	0.00027	0.00025
M-12	Espejo de Agua	0.00019	0.00021	0.00024	0.00025
M-13	Transecto 4 de aves	0.00009	0.00007	0.00005	0.00025
M-14	Canal 3	0.00052	0.00043	0.00032	0.00025
M-15	Pisciplaya 2	0.00012	0.00009	0.00011	0.00025
M-16	Piezómetro 1	0.00035	0.00009	0.00004	0.00025
M-17	Piezómetro 2	0.00043	0.00124	0.00138	0.00025

En las Tablas 3 y 4 se describen los parámetros fisicoquímicos de las estaciones de muestreo que se obtuvieron durante el año 2022 y de las que se aislaron las levaduras.

Tabla 3: Concentración de Pb y adicionalmente de Cd en los cuerpos de agua del Area de Conservación Regional Humedales de Ventanilla durante el 2022, concentración expresada en mg/L

Estaciones	Lugar	Pb (mg/L)	Pb-ECA	Cd (mg/L)	Cd-ECA
		Enero 2022	2017	Enero 2022	2017
J1	Piezómetro	0.0257	0.0025	0.00103	0.00025
J2	Espejo Rojo	0.0066	0.0025	0.00021	0.00025
J3	Cañaveral	0.0040	0.0025	0.00019	0.00025
J4	Canal Cerco	0.0123	0.0025	0.00015	0.00025
J5	Filtro de agua	0.0110	0.0025	0.00076	0.00025
J6	Pisciplaya	0.0002	0.0025	0.00009	0.00025

Fuente. Fajardo & Wong, 2022

Table 4: Parámetros de campo de las estaciones de muestreo

Estaciones	Lugar	pH	Temperatura	Oxígeno disuelto	Conductividad
			(°C)	(mg/L)	(mS/cm)
J1	Piezómetro	8.87	22	4.78	37.6
J2	Espejo Rojo	9.83	33.1	15.76	86.5
J3	Cañaveral	9.52	33.3	12.73	21.9
J4	Canal Cerco	9.09	28.1	10.3	14.8
J5	Filtro de agua	8.72	27.6	7.31	15.4
J6	Pisciplaya	8.64	28.2	9.08	18.49

Fuente. Fajardo & Wong, 2022

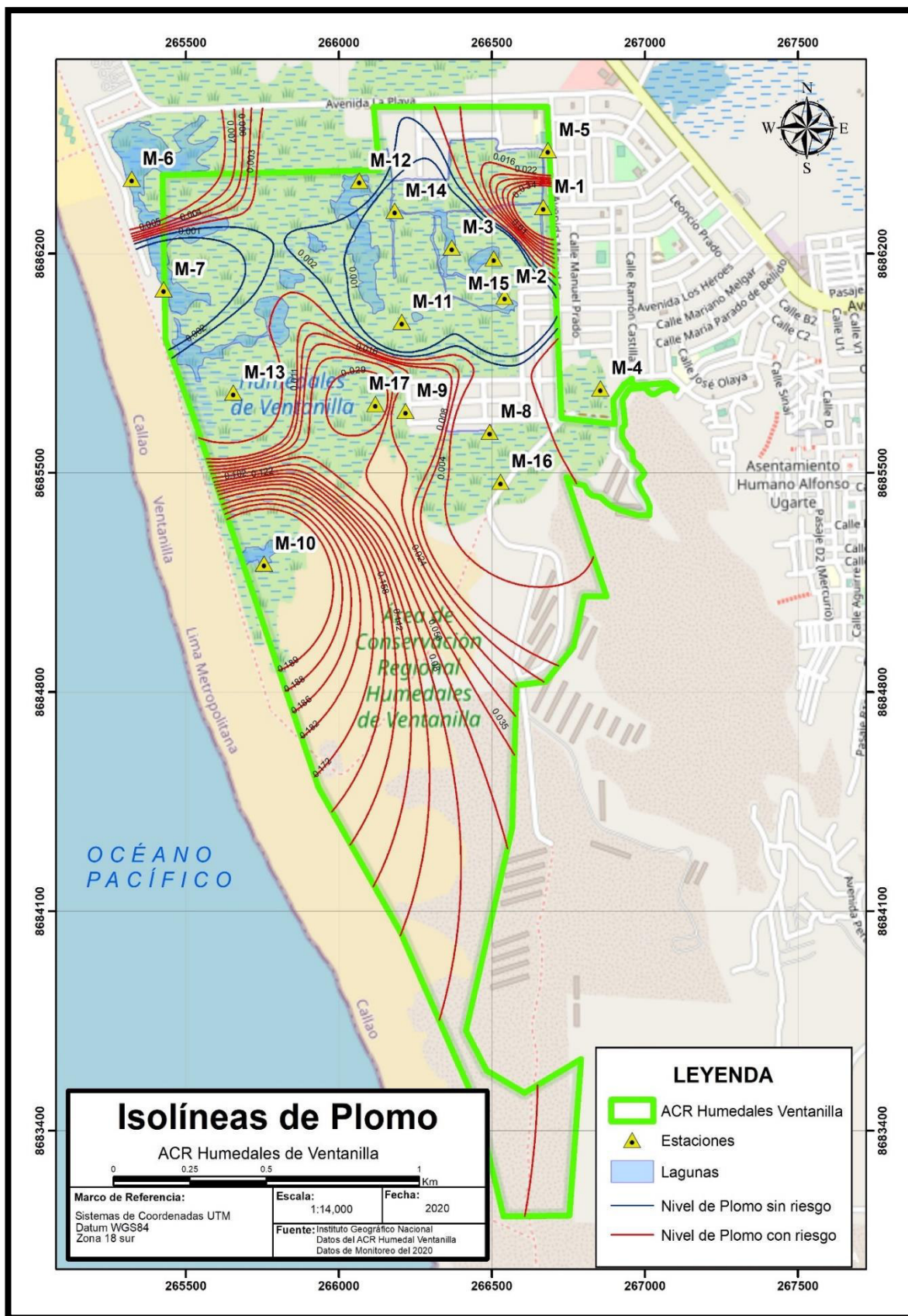


Figura 10: Isolínea de Pb del Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla

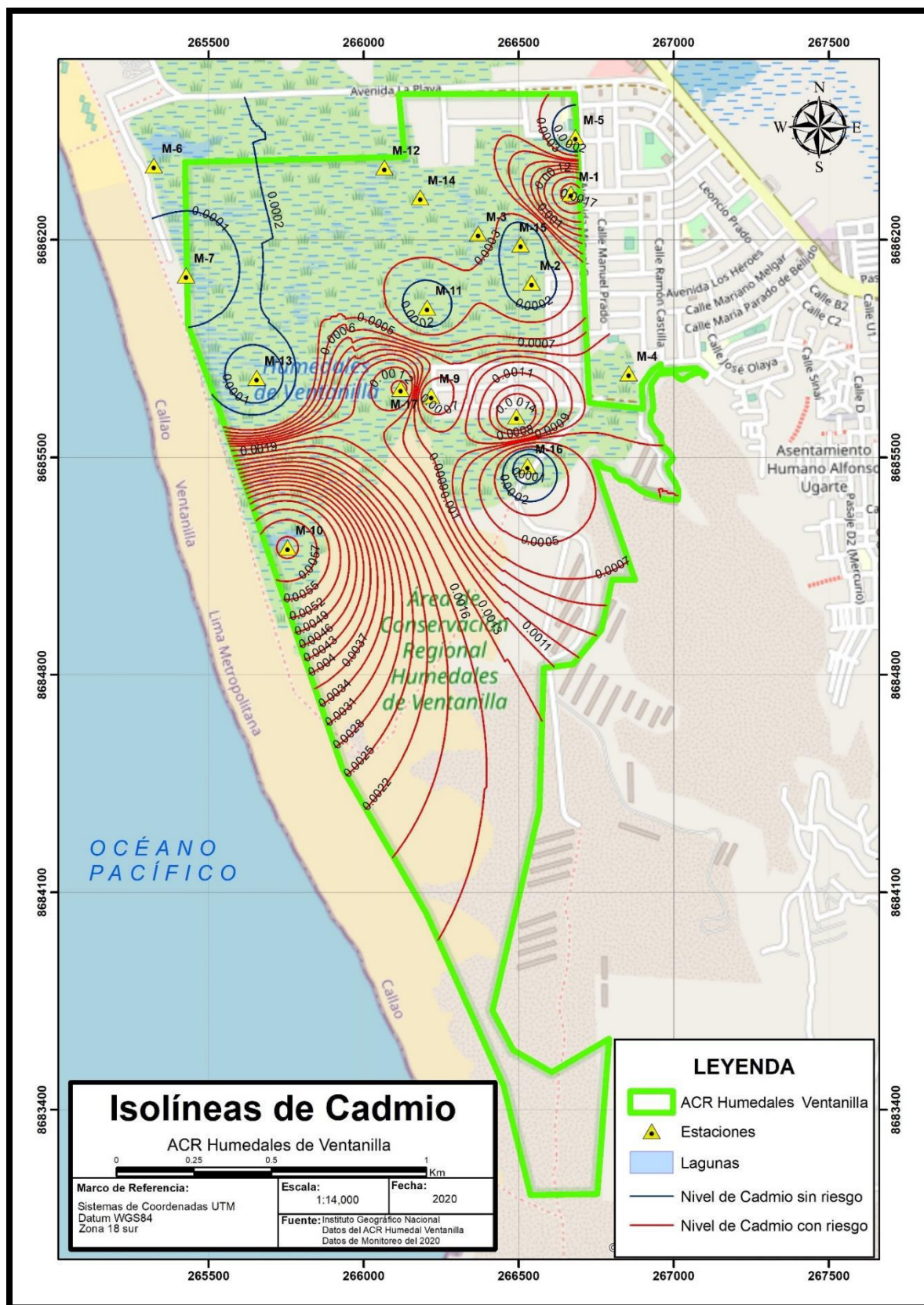


Figura 11: Isolénea de Cd del Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla

4.1.1 Valores de concentración de Pb en las estaciones de muestreo del Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla entre los años 2015 y 2022.

Se consideró este resultado en la selección de estaciones de muestreo para el aislamiento microbiológico (screening primario).

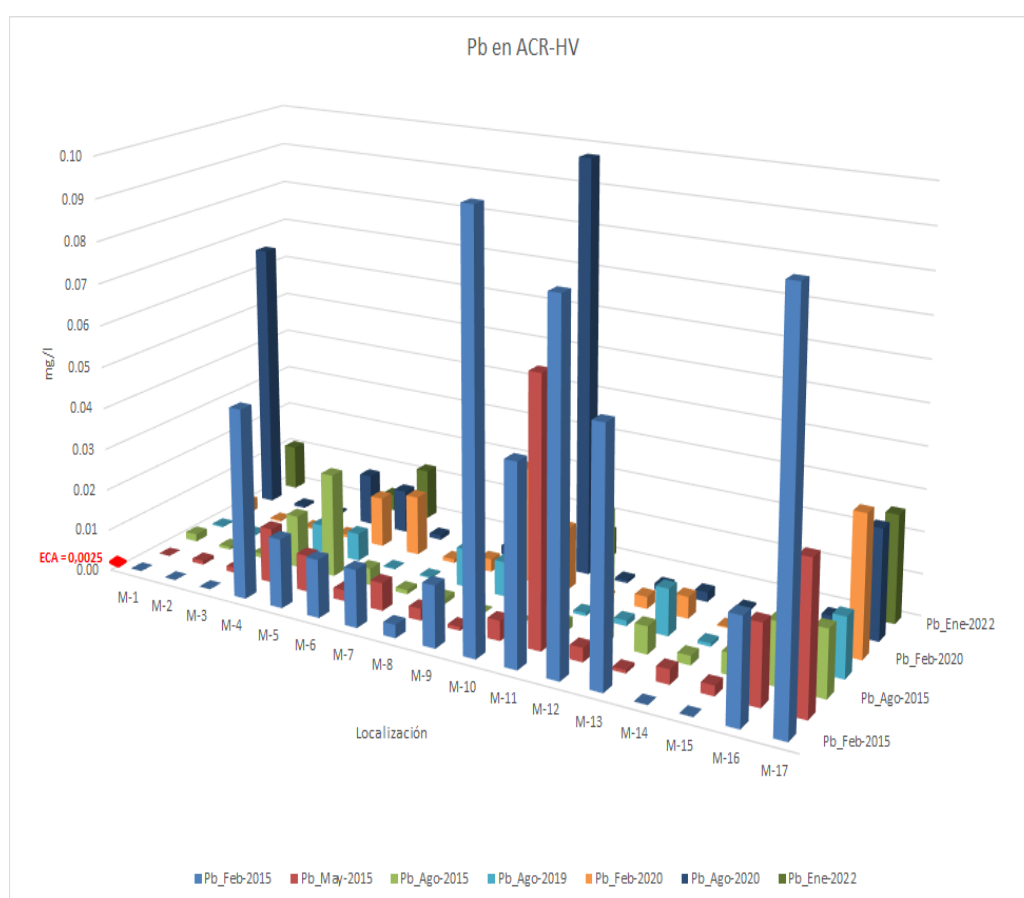


Figura 12: Valores de concentración de Pb en las estaciones de muestreo del Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla

Fuente. Fajardo & Wong, 2022

4.2. Resultados de la fase de laboratorio:

Del aislamiento de levaduras tolerantes a altas concentraciones de Pb y su identificación, se seleccionó a *Candida guilliermondii* (ver Tablas 5-8) por presentar los mejores resultados de tolerancia a concentraciones elevadas de Pb, crecimiento a diferentes pH, por sus reportes de aplicaciones biotecnológicas que incluyen resistencia a iones de cromo Cr (III) y Cr (IV) , también se reportó que podrían utilizarse para la degradación de contaminantes de hidrocarburos (Papon et al., 2013) y por la fuente de aislamiento que fue agua subterránea, se comparó con una levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* que según el estudio del arte es una de la más efectivas en remoción de Pb. En otras investigaciones se reporta como la temperatura más adecuada para el crecimiento del aislado de levadura *Candida tropicalis* resistente a Cd en 30°C a un pH 8 en ese estudio también reportaron a *Candida tropicalis* con alta resistencia contra diferentes iones de metales pesados que fueron desde 1.000 a 2.500 mg/L, la cantidad sustancial acumulada de Cd²⁺ del medio fue (92%) y aguas residuales (78%) y era adaptable a las condiciones ambientales locales. Por lo tanto, *C. tropicalis* se reportó como aplicable para el tratamiento de aguas residuales que contienen Cd (Rehman & Anjum, 2010). En la investigación de De Silóniz et al. (2002) se concluyó que la levadura *Pichia guilliermondii* sería un buen candidato para la remoción de Cu a partir de lodos y/o compost contaminados con metales, especialmente dados los máximos resultados de absorción de Cu obtenidos para células adaptadas viables (aproximadamente 20 mg/g). Los valores de absorción para *Pichia guilliermondii* adaptados fueron similares o mejores que otros descritos previamente para especies vivas de biomasa. Otros estudios plantearon que existe diferencias significativas en la remoción de metales por diferentes especies de levadura, y obtuvieron la mayor absorción de Cd y Pb con *Saccharomyces cerevisiae* en donde la capacidad de biosorción de Pb de todos los tipos de biomasa fue mayor que la del Cd (Kordialik, 2011).

4.2.1 Identificación de levaduras aisladas del ACR-HV

Tabla 5: Identificación de levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla en matraces de 250 ml con 100ml de caldo YPG y en caldo YPG-Pb (Se aislaron aplicando el protocolo de la figura 6)

Estación de muestreo	Caldo YPG /Caldo YPG con Pb	Cepa	Según coloración Gram	Identificación por API 32 C
Cepa comercial	Caldo YPG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
J1 (M-17)	Caldo YPG	J1	Levadura	<i>Candida guilliermondii</i>
J1 (M-17)	Caldo YPG + Pb	J1-JJJ	Levadura	<i>Candida guilliermondii</i>
J2 (M-10)	Caldo YPG	No se aisló	-	-
J2 (M-10)	Caldo YPG + Pb	No se aisló	-	-
J3 (M-4)	Caldo YPG	J3	Levadura	<i>Candida famata</i>
J3 (M-4)	Caldo YPG + Pb	J3-JJJ	Levadura	<i>Cryptococcus laurentii</i>
J4 (M-5)	Caldo YPG	J4	Levadura	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
J4 (M-5)	Caldo YPG + Pb	J4-JJJ	Levadura	<i>Cryptococcus laurentii</i>
J5 (M-1)	Caldo YPG	J5	Levadura	<i>Candida famata</i>
J5 (M-1)	Caldo YPG + Pb	J5-JJJ	Levadura	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
J6 (M-15)	Caldo YPG	J6	Levadura	<i>Cryptococcus humicola</i>
J6 (M-15)	Caldo YPG + Pb	No se aisló	-	-

De la estación J2 no se aisló ninguna levadura, el pH fue de 10.15, siendo de todas las estaciones de muestreo la más impactada en contenido de Pb (0.3644 mg/L).

Fuente. Fajardo & Wong, 2022

4.2.2 Levaduras aisladas del ACR HV tolerantes a diferentes concentraciones de Pb

Tabla 6: Cepas de levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla tolerantes a diferentes concentraciones de Pb a 24°C

Concentraciones de Pb en caldo YPG (mg/L)			1	1	5	5	10	10	1000
Código	Nombre de la cepa	Temperatura	pH 5	pH6	pH 5	pH6	pH5	pH6	pH6
CC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24 °C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
J1	<i>Candida guilliermondii</i>	24 °C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
J1-JJJ	<i>Candida guilliermondii</i>	24 °C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
J3	<i>Candida famata</i>	24 °C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
J3-JJJ	<i>Cryptococcus laurentii</i>	24 °C	++	++	+	+	+	+	+
J4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	24 °C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
J4-JJJ	<i>Cryptococcus laurentii</i>	24 °C	+	+	+	+	+	+	+
J5	<i>Candida famata</i>	24 °C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
J5-JJJ	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	24 °C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
J6	<i>Cryptococcus humicola</i>	24 °C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Fuente. Fajardo & Wong, 2022

Tabla 7: Levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla tolerantes a diferentes concentraciones de Pb a 30°C

Tolerancia a diferentes concentraciones de Pb en caldo YPG							
Cepa	Identificación	Temperatura de incubación	5 mg/L		10 mg/L		
			pH 5	pH6	pH 5	pH6	
Cepa comercial	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30 °C	+++	+++	+++	+++	
J1	<i>Candida guilliermondii</i>	30 °C	+++	+++	+++	+++	
J1 JJJ	<i>Candida guilliermondii</i>	30 °C	+++	+++	+++	+++	
J3	<i>Candida famata</i>	30 °C	++	++	++	++	
J3 JJJ	<i>Cryptococcus laurentii</i>	30 °C	-	-	-	-	
J4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	30 °C	+++	+++	+++	+++	
J4 JJJ	<i>Cryptococcus laurentii</i>	30 °C	+++	+++	+++	+++	
J5	<i>Candida famata</i>	30 °C	++	++	++	++	
J5 JJJ	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	30 °C	+++	+++	+++	+++	
J6	<i>Cryptococcus humicola</i>	30 °C	+++	+++	+++	+++	

Tabla 8: Levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla tolerantes a diferentes concentraciones de Pb a 36°C

Tolerancia a diferentes concentraciones de Pb en caldo YPG							
Cepa	Identificación	Temperatura de incubación	5 mg/L		10 mg/L		
			pH 5	pH6	pH 5	pH6	
Cepa comercial	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36 °C	+++	+++	+++	+++	
J1	<i>Candida guilliermondii</i>	36 °C	+++	+++	+++	+++	
J1 JJJ	<i>Candida guilliermondii</i>	36 °C	+++	+++	+++	+++	
J3	<i>Candida famata</i>	36 °C	+	+	+	+	
J3 JJJ	<i>Cryptococcus laurentii</i>	36 °C	-	-	-	-	
J4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	36 °C	+++	+++	+++	+++	
J4 JJJ	<i>Cryptococcus laurentii</i>	36 °C	+++	+++	+++	+++	
J5	<i>Candida famata</i>	36 °C	+	+	+	+	
J5 JJJ	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	36 °C	+++	+++	+++	+++	
J6	<i>Cryptococcus humicola</i>	36 °C	+++	+++	+++	+++	

4.3 Matriz experimental 1: Etapa inicial: a 24 °C / 150 rpm para suspensión

Aislamiento, análisis de levadura de mayor potencial en el ACR-HV y cultivo de levadura activa comercial *Saccharomyces cerevisiae* en agar y traspaso a suspensión.

Cultivo de levadura activa (a) ACR-HV y (b) comercial: En agar YPG a concentración inicial 0.1, 0.2, 0.4 y 0.6 mg /L determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC) en caldo YPG / importante para determinar límites de concentración para operación de microorganismo activo.

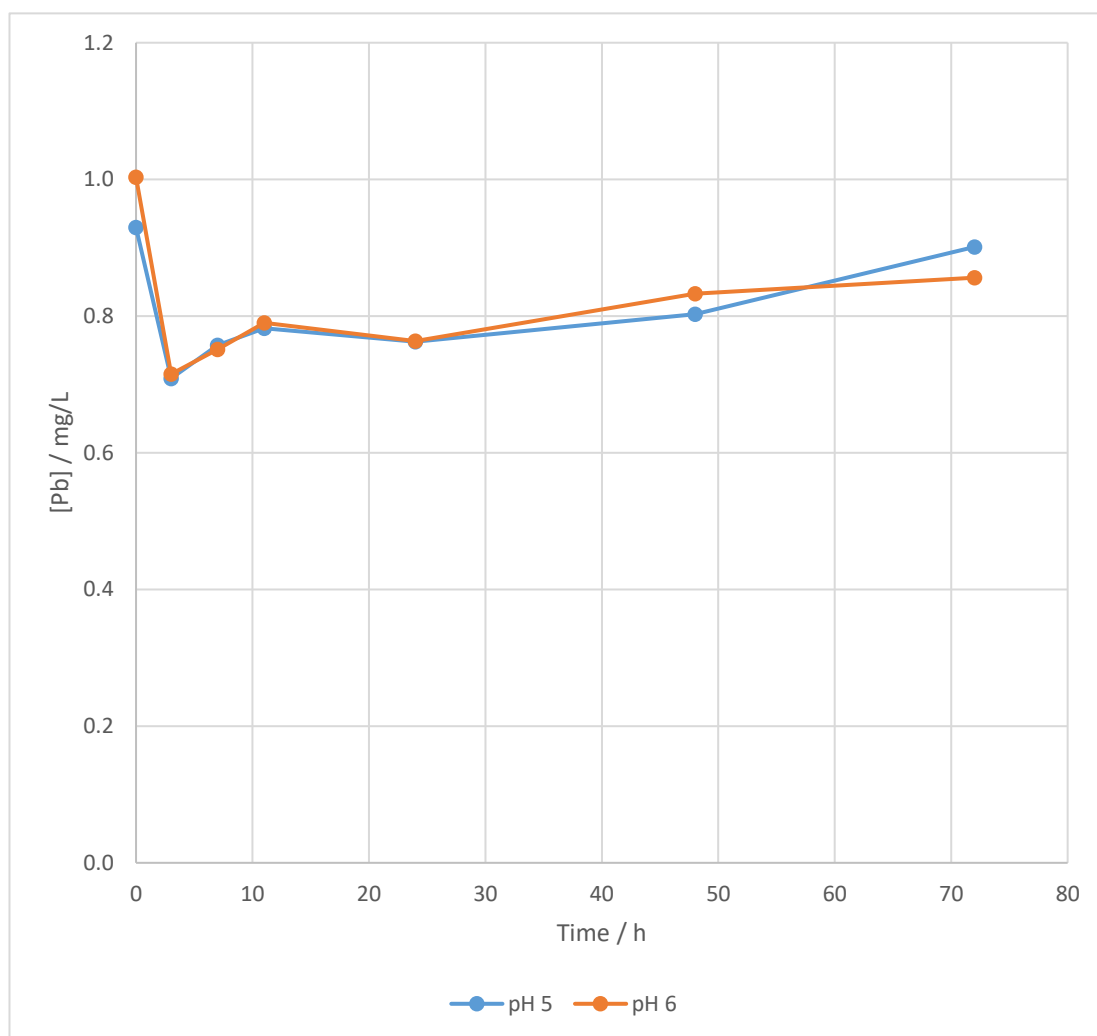
Tabla 9: Matriz experimental 1 para determinar tipo de levadura activa más eficiente

Tipo de levadura activa más eficiente: En cultivo standard YPG glucosa-levadura-peptona (Saitoh et al. 2020)

Tipo de cepa de levadura:	levadura (S.c. de pan o alcohol)	levadura de campo: ACR-HV	
pH	5	6	T = 30°C La concentración de inóculo debe ser similar para ambos casos
Tiempo = máximo 72 h	Fuente de obtención: levadura comercial seca o instantánea comercial panadera.		t = 72h
Nota: se debe tener un cultivo de levadura activa ya previamente preparado desde una etapa cultivo agar pasando por un cultivo en suspensión para disponibilidad de inóculo.			[Pb] ₀ = 1 mg/L o bien la concentración MIC dependiendo de resultado de placa
			ω fija = 150 rpm

4.4 Resultados de la matriz experimental 1

En la investigación ambas levaduras se evaluaron en una matriz de diseño experimental como levaduras activas, la concentración de Pb inicial fue de 1 mg/L en el sistema de matraces con caldo YPG y levadura evaluada, obteniéndose en ambas levaduras tendencias similares en los mismos intervalos de tiempo de remoción de Pb (ver Figuras 13 y 14).



*Figura 13: Concentración de Pb (mg/L) durante remoción por *Candida guilliermondii* como biomasa de levadura activa*

Fuente. Fajardo & Wong, 2022

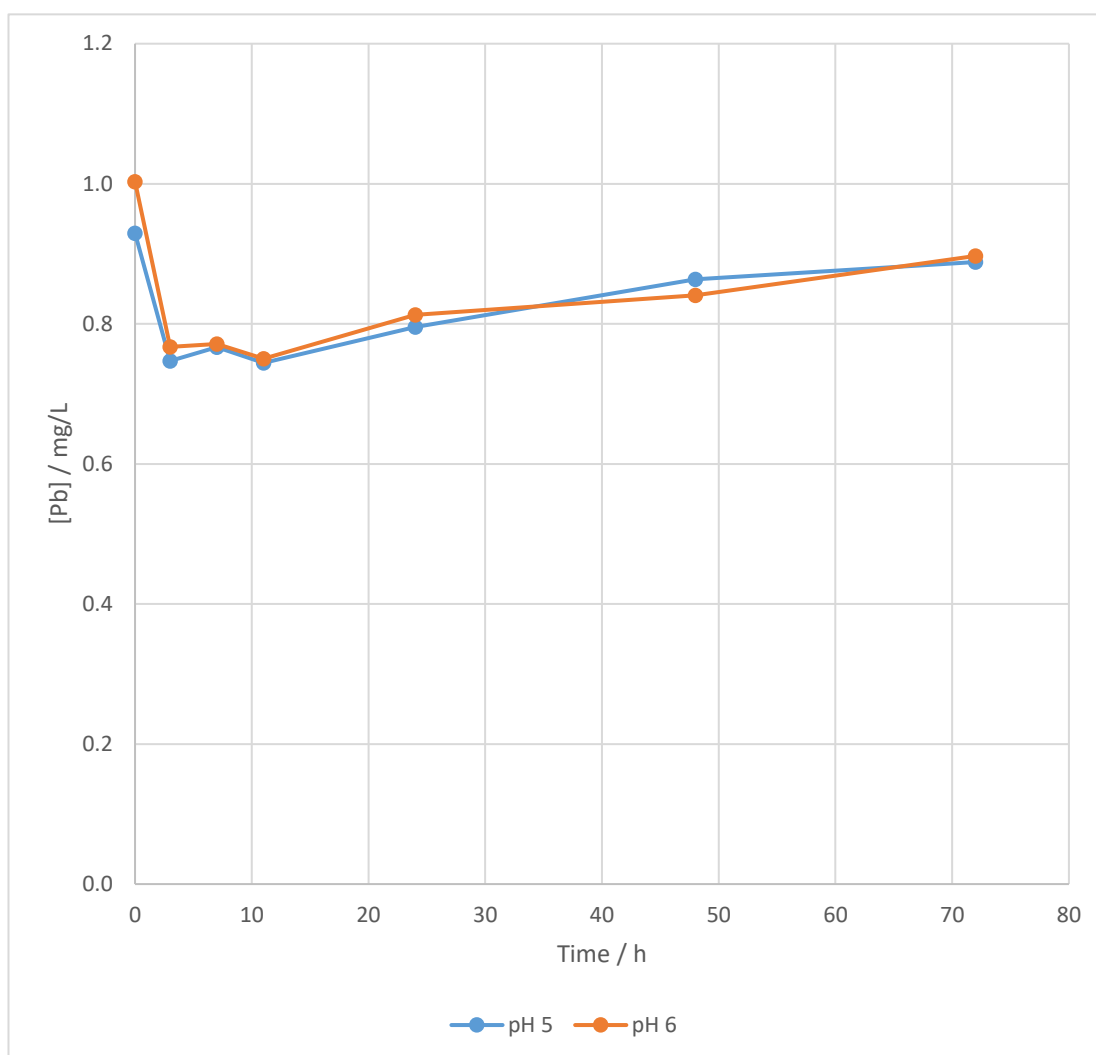


Figura 14: Concentración de Pb (mg/L) durante remoción por *Saccharomyces cerevisiae* como biomasa de levadura activa

Fuente. Fajardo & Wong, 2022

Tabla 10: Recuento en placas de la población final microbial al término del proceso de remoción de Pb como biomasa activa de levadura en la matriz experimental 1

Recuento en placas de la población final obtenida del inoculo inicial (UFC/ml)		
Cepa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
Placa 1 (Inicial)	40×10^6	36×10^6
Placa 2 (Inicial)	41×10^6	31×10^6
Promedio	41×10^6	34×10^6

Cepa / pH	A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / pH 5	B <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / pH 5	C <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / pH 5
Placa 1 (Final)	82 × 10 ⁶	88 × 10 ⁶	86 × 10 ⁶
Placa 2 (Final)	80 × 10 ⁶	91 × 10 ⁶	92 × 10 ⁶
Promedio	81 × 10 ⁶	90 × 10 ⁶	89 × 10 ⁶
Cepa / pH	A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / pH 6	B <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / pH 6	C <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / pH 6
Placa 1 (Final)	64 × 10 ⁶	57 × 10 ⁶	64 × 10 ⁶
Placa 2 (Final)	70 × 10 ⁶	77 × 10 ⁶	68 × 10 ⁶
Promedio	67 × 10 ⁶	67 × 10 ⁶	66 × 10 ⁶
Cepa / pH	A <i>Candida guilliermondii</i> / pH 5	B <i>Candida guilliermondii</i> / pH 5	C <i>Candida guilliermondii</i> / pH 5
Placa 1 (Final)	10 × 10 ⁸	12 × 10 ⁸	12 × 10 ⁸
Placa 2 (Final)	11 × 10 ⁸	13 × 10 ⁸	13 × 10 ⁸
Promedio	11 × 10 ⁸	13 × 10 ⁸	13 × 10 ⁸
Cepa / pH	A <i>Candida guilliermondii</i> / pH 6	B <i>Candida guilliermondii</i> / pH 6	C <i>Candida guilliermondii</i> / pH 6
Placa 1 (Final)	84 × 10 ⁷	11 × 10 ⁸	16 × 10 ⁸
Placa 2(Final)	92 × 10 ⁷	12 × 10 ⁸	14 × 10 ⁸
Promedio	88 × 10 ⁷	12 × 10 ⁸	15 × 10 ⁸

En la tabla 10 se describe los valores de unidades formadoras de colonias obtenidas de los inóculos iniciales y de los matraces del sistema al término de la matriz experimental 1.

También se compararon las tendencias de remoción del sistema Pb en presencia de Cd como levaduras inactivadas a 45°C y muertas a 121°C. La concentración inicial de Pb fue 3.2814 mg/L y para el Cd 0.17135 mg/L en matraces con agua desionizada a pH 6, el peso de levadura inactivada fue 1 g.

Para la inactivación se generó biomasa de ambas levaduras por separado en caldo YPG a pH 6 a las 48 h de crecimiento en caldo YPG se procedió a centrifugar en tubos Falcon de 50 ml a 2,600 rpm durante 10 minutos, los sobrenadantes se eliminaron y se suspendieron los sedimentos en agua destilada estéril para proceder a una segunda centrifugación como lavado, el sobrenadante se eliminó y los sedimentos ya lavados se secaron a 45°C en estufa durante 24 h. Las levaduras inactivadas y muertas se

molieron y se tamizaron con malla U.S MESH número 35 de 0.5 mm generando granulometría D50 (50% de pasante y 50% de retenido). Las gráficas de tendencia de remoción de Pb y Cd fueron similares para los 3 primeros tiempos de 1, 3 y 24 h en ambas levaduras inactivadas. En la investigación se evaluó la biosorción de Pb en presencia de Cd en solución acuosa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida guilliermondii* inactivadas ambas a 45°C y muertas a 121°C; obteniéndose los mejores resultados en las primeras 24 h de contacto, donde los valores de Pb disminuyeron a 0.3412 mg/L y 0.1159 mg/L y los valores del Cd acompañante a 0.1159 mg/L a 24 h y 0.0106 mg/L a 1h de contacto con *Candida guilliermondii* tal como se observa en la Figura 15.

Para *Saccharomyces cerevisiae* los mejores resultados también fueron a las 24 h de contacto donde los valores de Pb disminuyeron a 0.0318 mg/L y 0.0817 mg/L y los valores de Cd a 0.01519 mg/l a las 24 h y 0.01353 mg/L a las 3 h de contacto a 45°C y 121°C respectivamente (ver Figura 16), en otras investigaciones se reportaron buenos resultados de inactivación a 45°C para *Saccharomyces cerevisiae*.

El tratamiento térmico de las levaduras a diferentes temperaturas (inactivadas y muertas) tuvo un efecto significativo sobre la eliminación de Pb empleando *Candida guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae* similares a los reportados en remoción de Cr por *Saccharomyces cerevisiae* (De Rossi et al., 2018).

Otro estudio (Sampaio et al., 2018) informó de los humedales boscosos mediterráneos como buenos lugares para el aislamiento de levaduras para la biorremediación de colorantes y destacan la importancia de conservar estos ecosistemas. Entre las levaduras, las más estudiadas son *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus* y *Saccharomyces* (Moreno & Clamont, 2018; Phu et al., 2021). La caracterización de microorganismos en ambientes contaminados es importante para comprender los impactos como drenaje de ácido de minas (AMD) en la ecología y evolución microbiana, para identificar microorganismos que tienen propiedades de biorremediación y para comprender los mecanismos de tolerancia y remediación microbiana de AMD (Aguinaga et al., 2018) El pH óptimo para la absorción de Pb de *Candida guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae* fue a pH 5 y 6 como levaduras activas, en otras investigaciones se reporta

el pH 5 como óptimo para *Saccharomyces cerevisiae* en procesos de remoción (Massoud et al., 2019).

4.4.1 Resultados de remoción como levaduras inactivadas y muertas con dos tratamientos térmicos de desactivación de biomasa a 45°C y 121°C

En la Figura 15 puede observarse que el tratamiento térmico de la biomasa adsorbente (muerta) influye significativamente en la capacidad de adsorción de Pb por la biomasa nativa, llegando a 0.1565 mg Pb / L medio líquido luego de tan sólo 1 h para tratamiento a 121 °C.

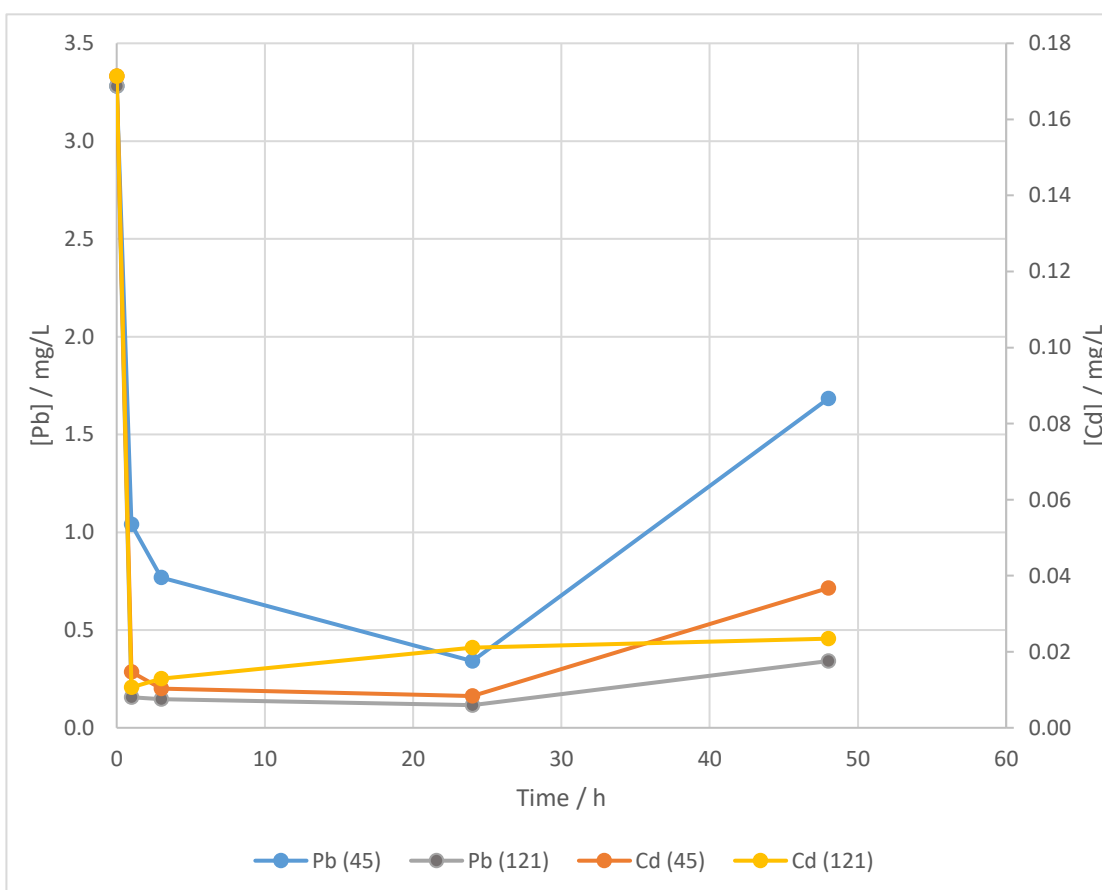


Figura 15: Concentración de Pb y Cd (mg/L) durante adsorción por biomasa inactivada de *Candida guilliermondii* a pH 6 y con dos diferentes tratamientos térmicos de desactivación de biomasa (levadura inactivada a 45°C y levadura muerta a 121°C).

Fuente. Fajardo & Wong, 2022

En la Figura 16 puede observarse que el tratamiento térmico de la biomasa comercial adsorbente (muerta) también influye significativamente en la capacidad de adsorción de Pb y Cd por la biomasa *Saccharomyces cerevisiae*, llegando a 0.1349 mg Pb / L medio líquido luego de tan sólo 1 h para tratamiento a 121 °C.

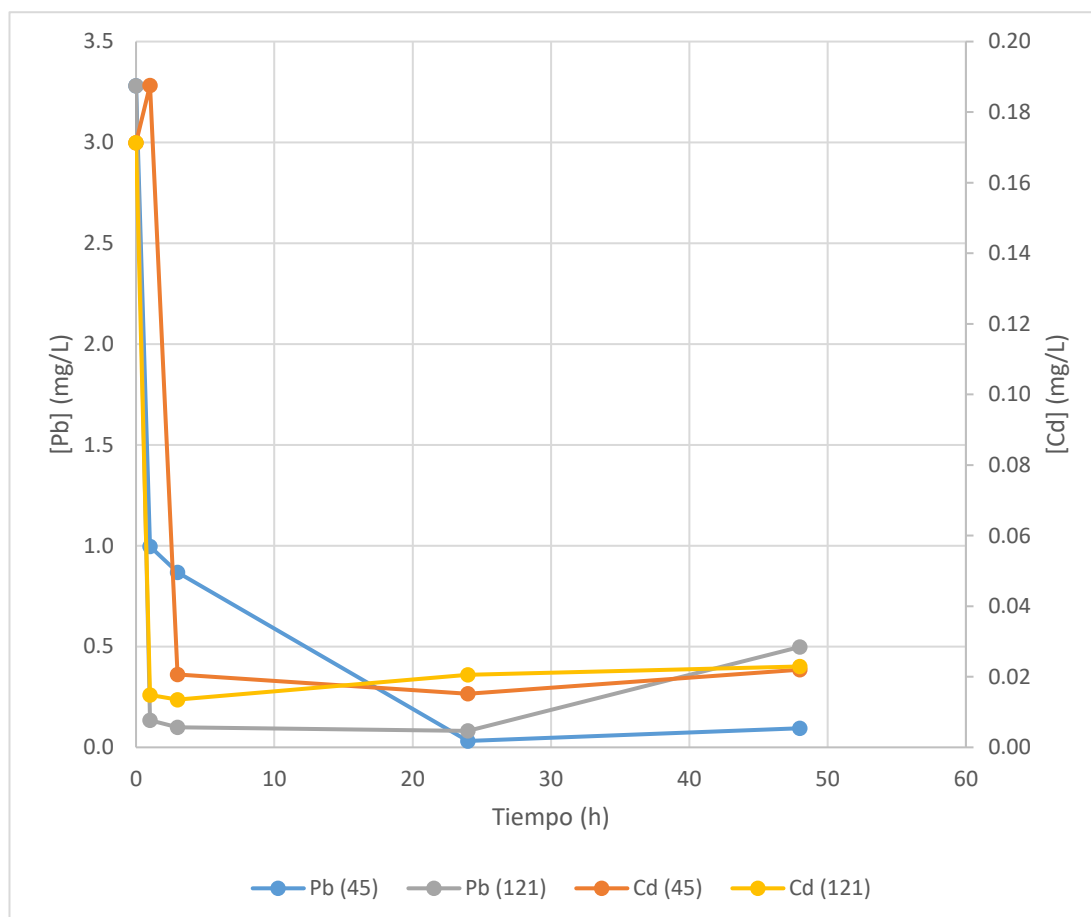


Figura 16: Concentración de Pb y Cd (mg/L) durante adsorción por biomasa inactivada de *Saccharomyces cerevisiae* a pH 6 y con dos diferentes tratamientos térmicos de desactivación de biomasa (levadura inactivada a 45°C y levadura muerta a 121°C).

Fuente. Fajardo & Wong, 2022

En la figura 17 y 18 se ilustran los resultados de adsorción que se obtuvieron con biomasa inactivada de levadura cervecera residual proporcionada por una planta de Lima y los resultados de la matriz estructural (50% de levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* con 50% de tierra de diatomea) muertas a 80°C y 100°C respectivamente.

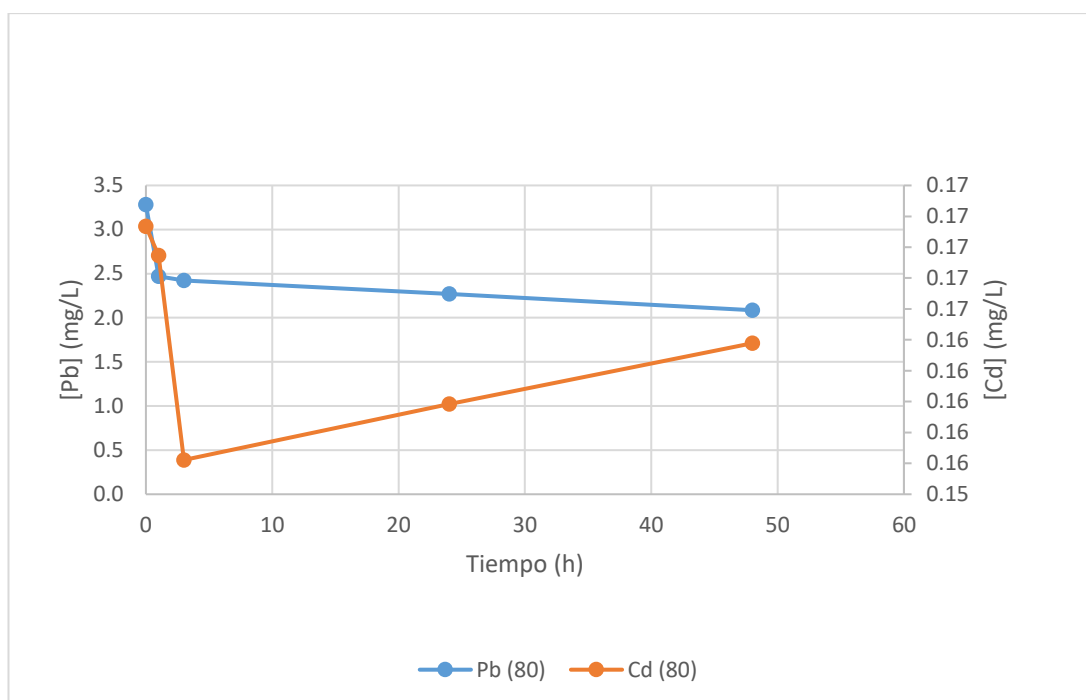


Figura 17: Concentración de Pb y Cd (mg/L) durante adsorción por biomasa muerta de levadura cervecera residual (*Saccharomyces cerevisiae*) con tratamiento térmico de desactivación de 80°C

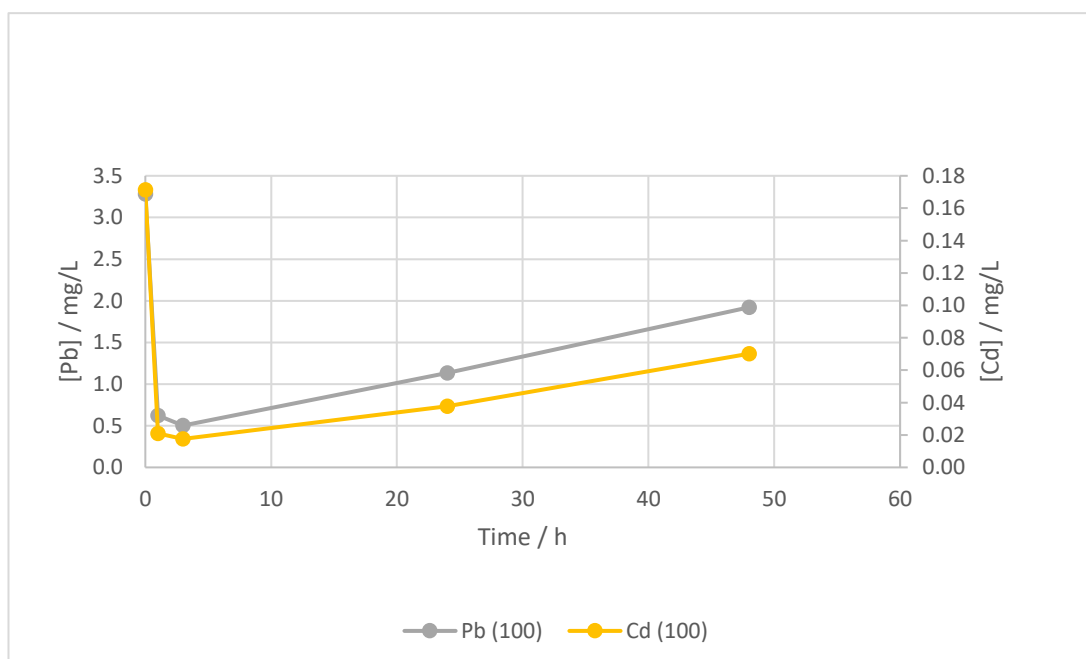


Figura 18: Concentración de Pb y Cd (mg/L) durante adsorción por biomasa muerta de levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* con tierra de diatomea y con tratamiento térmico de desactivación de 100°C

4.5 Matriz experimental 2 / diseño experimental con biomasa de levadura muerta:
Determinación de un modelo multivariable predictivo para la variable de respuesta porcentaje Pb removido en presencia de Cd

El modelamiento de la matriz 2 del diseño central compuesto (CCD) se realizó en la matriz estructural compuesta por *Saccharomyces cerevisiae* (cepa comercial - referencial) con tierra de diatomea (soporte de sílice) por presentar los mejores resultados de remoción en Pb en presencia de Cd en la primera hora de contacto.

En las Tablas 11 -13 se describen las características de la matriz experimental 2 realizadas en el laboratorio; se trabajó con diferentes granulometrías y concentraciones de Pb y Cd en agua desionizada a pH 6.

En la Figura 19 se presentó la optimización de variable granulometría D50 en sorbente (sólido) de acuerdo a la concentración de Pb y Cd.

Tabla 11: Diseño experimental de matriz 2

Variables manipuladas	Nivel		
	-1 (bajo)	1 (alto)	
pH	6	6	-
Concentración inicial Pb = [Pb] ₀	3	10	mg/l
Concentración inicial Cd = [Cd] ₀	0.10	0.8	mg/l
Granulometría biomasa inactiva	0.85	2.36	mm*

* Se midió granulometría de biomasa luego de tratamiento térmico y secado a 100 °C durante 24 h / tamaño medio de partícula: D50 = 0.85 mm para malla 20, D50 = 1 mm para malla 18, D50 = 1.7 mm para malla 12, D50 = 2 mm para malla 10, D50 = 2.36 mm para malla 8.

Tabla 12: Metodología superficie de respuesta / optimización

Diseño central compuesto (CCD) con 3 puntos centrales y 2 réplicas por tratamiento (dividir en 2 bloques por restricción en capacidad de agitador-incubador TOU-120)

100 ml como valor uniforme en cada muestra de solución / suspensión (en matraz de 250 ml)

T fija = 30 °C

Formación de hidróxido de Fe precipitante a pH > 6

Concentración fija de biomasa inactiva = 5 g_{MS}/l (la concentración inicial de ion Pb es variada) Se fija pH en 6 (en base a estado del arte)

Se tomó alícuotas de 10 ml a 1 h, 2 h, 4 h y 7 h → y se guardó en tubo Falcon para posterior análisis de fases líquida por ICP- masas y pesado de fase sólida.

4.6 Resultados de la matriz experimental 2

Tabla 13: Valores de concentración y granulometría analizados en la matriz 2: Diseño experimental central compuesto (CCD) para optimización de valores de variables

Orden de corrida	Bloque	Controles	[Pb] ₀ , real (mg/l)	[Cd] ₀ , real (mg/l)	[Pb] ₀ , calc (mg/l)	[Cd] ₀ , calc (mg/l)	D50 (mm)
1	2	C3	3.8759	0.54520	4.00	0.60	2.00
2	2	C7	9.9206	0.38621	9.36	0.40	1.70
3	2		3.8759	0.54520	4.00	0.60	1.00
4	2	C4	5.4774	0.36416	6.00	0.40	1.70
5	2	C2	5.1243	0.75788	6.00	0.74	1.70
6	2	C6	3.7981	0.17927	4.00	0.20	2.00
7	2	C5	5.6946	0.09170	6.00	0.06	1.70
8	2	C9	8.1577	0.18234	8.00	0.20	2.00
9	2		5.4774	0.36416	6.00	0.40	1.70
10	2		8.1577	0.18234	8.00	0.20	1.00
11	2	C8	8.0558	0.56950	8.00	0.60	2.00
12	2		8.0558	0.56950	8.00	0.60	1.00
13	2		5.4774	0.36416	6.00	0.40	1.70
14	2		5.4774	0.36416	6.00	0.40	0.85
15	2	C1	6.6050	0.35386	7.00	0.40	1.70
16	2		3.7981	0.17927	4.00	0.20	1.00
17	2		5.4774	0.36416	6.00	0.40	2.36
18	1		3.8759	0.54520	4.00	0.60	1.00
19	1		9.9206	0.38621	9.36	0.40	1.70
20	1		6.6050	0.35386	7.00	0.40	1.70
21	1		8.0558	0.56950	8.00	0.60	2.00
22	1		3.7981	0.17927	4.00	0.20	1.00
23	1		5.4774	0.36416	6.00	0.40	2.36
24	1		5.4774	0.36416	6.00	0.40	0.85
25	1		8.1577	0.18234	8.00	0.20	2.00
26	1		8.1577	0.18234	8.00	0.20	1.00
27	1		5.4774	0.36416	6.00	0.40	1.70
28	1		8.0558	0.56950	8.00	0.60	1.00
29	1		5.4774	0.36416	6.00	0.40	1.70
30	1		5.1243	0.75788	6.00	0.74	1.70
31	1		3.8759	0.54520	4.00	0.60	2.00
32	1		5.6946	0.09170	6.00	0.06	1.70
33	1		5.4774	0.36416	6.00	0.40	1.70
34	1		3.7981	0.17927	4.00	0.20	2.00

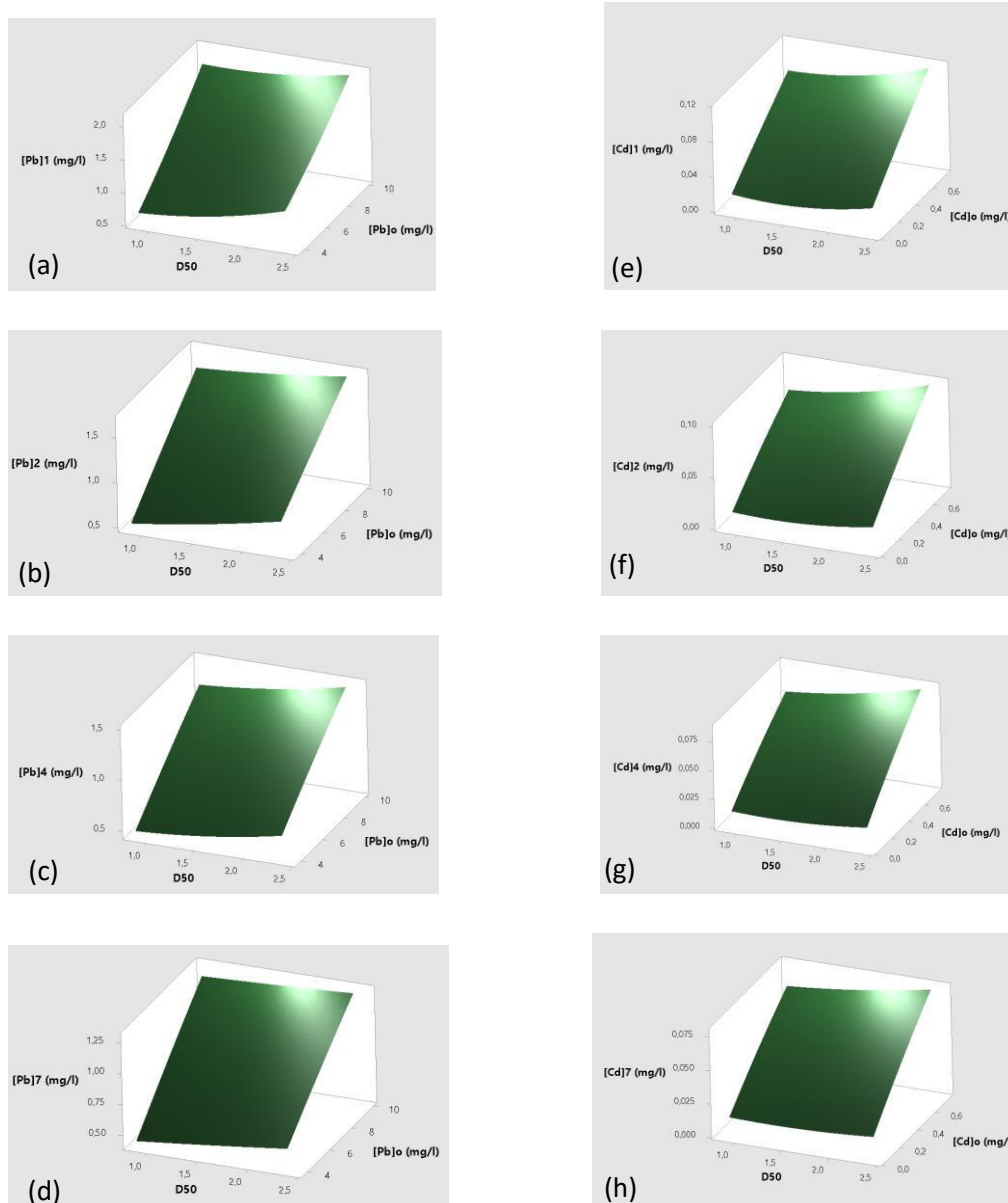


Figura 19: Optimización de variable granulometría D50 en sorbente (sólido) de acuerdo a la concentración de Pb y Cd, para cualquier concentración inicial de metal pesado $[X]_0$ y hasta tiempo de operación. (a), (b), (c) y (d) muestran un valor óptimo aprox. $D50 = 1.0$ mm para una eficiente adsorción de Pb. (e), (f), (g) y (h) muestran un valor óptimo aprox. $D50 = 1.5$ mm para una eficiente adsorción del Cd acompañante.

4.7 Matriz experimental 3

La levadura, el desecho de la fermentación, se obtuvo de una corporación industrial de fermentación de cervecera ubicada en Lima. La levadura de desecho se centrifugó y lavó con agua destilada dos veces con una centrifugación a 2600 rpm durante 5 minutos, el sedimento se secó a 100 °C en un horno durante 24 h. La levadura seca se tamizó en tamiz de malla N°18 con un tamaño de partícula 1 mm.

En la Tabla 14 se detallan las condiciones que se trabajaron en la matriz experimental 3

Tabla 14: Características de la matriz experimental 3

Condición biomasa	J1-JJJ (Muerta)	Muerta (matriz diatomea – levadura instantánea <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Muerta (matriz residual de producción cervecera)
pH	6	6	6
Temperatura (°C)	30	30	30
Volumen	100 ml	100 ml	100 ml
Medio agua a tratar para biosorción	Agua ACR-HV (sin esterilizar)	Agua ACR-HV (sin esterilizar)	Agua ACR-HV (sin esterilizar)
Concentración inicial	5 gms/l	5 gms/l	5 gms/l
[Cd] ₀	0.00035 mg/l	0.00035 mg/l	0.00035 mg/l
[Pb] ₀	0.0034 mg/l	0.0034 mg/l	0.0034 mg/l
Granulometría	D50 malla 18	D50 malla 18	D50 malla 18
Tratamiento:	por triplicado	por triplicado	por triplicado
No. matraces	3	3	3

4.8 Resultados de la matriz experimental 3

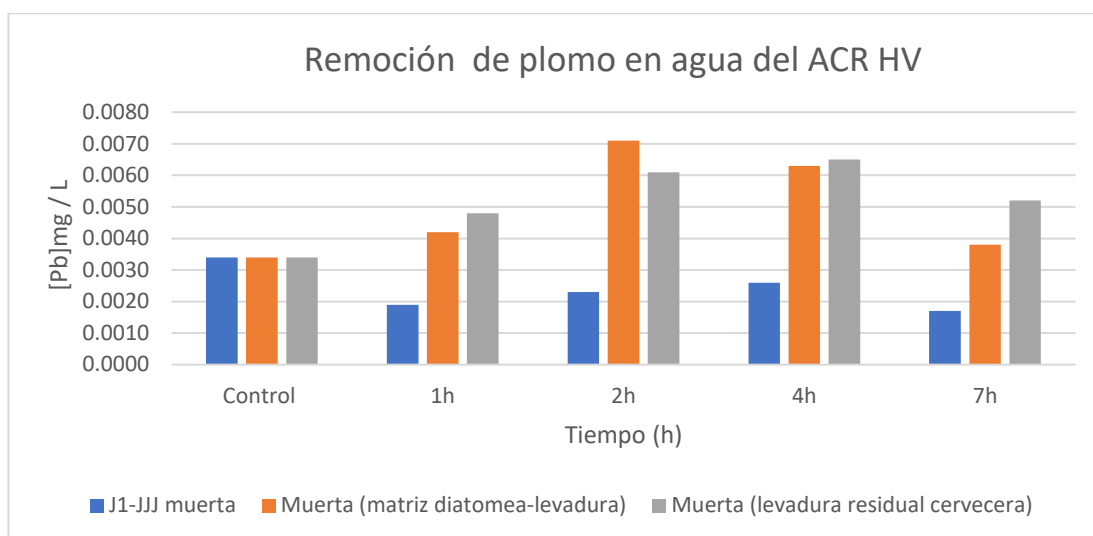


Figura 20: [Pb] (mg/L) durante el proceso de remoción en las tres matrices estructurales muertas evaluadas en agua del ACR Humedales de Ventanilla en presencia de Cd.

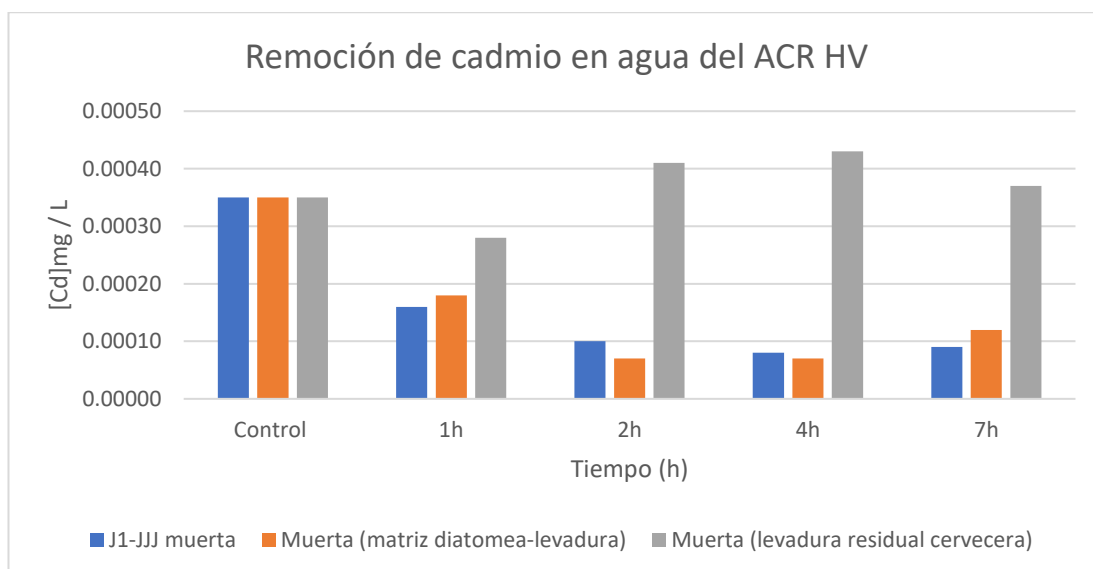


Figura 21: [Cd] (mg/L) durante el proceso de remoción de Pb en las tres matrices estructurales muertas evaluadas.

Tabla 15: Pesos recuperados después del proceso de remoción de Pb en presencia de Cd en las tres matrices estructurales muertas evaluadas.

Numero	Matrices estructurales	Peso Final (g)	Peso inicial (g)	Peso recuperado (g)
A	J1-JJJ muerta	1.5574	1.1170	0.4404
B	J1-JJJ muerta	1.5462	1.1092	0.4370
C	J1-JJJ muerta	1.5455	1.1136	0.4319
	Promedio	1.5497	1.1133	0.4364
A	Muerta (matriz diatomea- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1.4897	1.1208	0.3689
B	Muerta (matriz diatomea- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1.4723	1.1075	0.3648
C	Muerta (matriz diatomea- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1.4802	1.1149	0.3653
	Promedio	1.4807	1.1144	0.3663
A	levadura residual cervecera (Muerta)	1.4785	1.1010	0.3775
B	levadura residual cervecera (Muerta)	1.4710	1.0980	0.3730
C	levadura residual cervecera (Muerta)	1.4682	1.0905	0.3777
	Promedio	1.4726	1.0965	0.3761

De las 3 matrices estructurales de levaduras presentadas en la Tabla 14, de las evaluadas J1-JJJ es la que presentó mejores resultados de recuperación de bioadsorbente después del proceso de adsorción, con un 0.4364 g en promedio, lo cual representa un 87.28% del peso original de cada bioadsorbente (0.5g).

En la investigación en la matriz experimental 3 que se ilustró en la Tabla 14 y se observó en las Figuras 20 y 21 se evaluó *Candida guilliermondii* como levadura muerta con granulometría D50 1 mm comparándola con levadura muerta (matriz tierra

de diatomea con levadura instantánea *Saccharomyces cerevisiae*) y una levadura residual cervecera muerta, en un sistema con pH 6, 30°C a 150 rpm con concentraciones iniciales de Cd y Pb (0.00035 mg/L y 0.0034mg/L respectivamente) y en agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla, en dicho sistema *Candida guilliermondi* (levadura nativa) presentó los mejores resultados de remoción llegando a valores por debajo del límite establecido por el ECA Agua 2017 (0.00008 y 0.0017 mg/L en concentración final de Pb y Cd respectivamente). Comparando lo obtenido con la investigación de Akpomie et al. (2012) quienes descubrieron que la arcilla Ehandiagu es un excelente y económico adsorbente para la eliminación de iones Pb (II) de una solución acuosa. El experimento por lotes que estudiaron demostró un aumento en la capacidad de adsorción con el aumento de la concentración de iones metálicos; sin embargo, se registraron una disminución en el porcentaje adsorbido con el aumento de la concentración. En esa investigación el parámetro de regresión isotérmica de equilibrio (R^2) mostró que la isoterma de Langmuir dio un mejor ajuste que la isoterma de Freundlich: 0.9787 frente a 0.9298 respectivamente. Las arcillas presentan en su composición silicatos y la tierra de diatomea (sílice) se les estudia por su polimerización y evaluando si presentan capacidad de adsorción de metales.

En otras investigaciones se plantea a la piedra pómez que es una roca volcánica ígnea y porosa, producida por la reacción química de los gases efluentes durante la solidificación de la lava (Hara et al.,1979; Panuccio et al.,2009). Tiene un alto contenido de sílice (70,90 % SiO_2). La sílice otorga durabilidad al material, por lo que es adecuado como un excelente adsorbente frente a factores externos agresivos, en su diseño factorial fraccionado evaluaron seis parámetros, C_0 , pH, temperatura, tiempo de contacto, tamaño de partícula y velocidad de agitación, seleccionándose la cantidad de Pb (II) adsorbido como respuesta. Sus resultados determinan que la piedra pómez que emplearon y tenía la composición de vidrio de sílice (SiO_2 %) con cantidades más pequeñas de Al_2O_3 , MgO, Na_2O , CaO y K_2O presentó la mayor capacidad de adsorción de Pb, concluyéndose que es un adsorbente útil para aguas residuales contaminadas con Pb y otros metales pesados (Sahan & Ozturk, 2014). En nuestro diseño de matriz 3 la levadura *Candida guilliermondii* presentó los mejores resultados en un diseño experimental donde se le comparo con una matriz estructural compuesta por tierra de diatomea (sílice) y levadura *Saccharomyces cerevisiae* en su composición.

Bruna Silva et al., 2019 menciona que el análisis de costos es uno de los criterios más importantes para la selección de cualquier proceso de tratamiento. El costo de los procesos de adsorción depende principalmente del costo del adsorbente utilizado. Aunque el carbón activado es uno de los adsorbentes más comunes y eficientes utilizados para la eliminación de microcontaminantes, su alto costo es una desventaja significativa, especialmente para los países en desarrollo. En la matriz experimental 3 se incluyó una levadura residual cervecera proporcionada por una cervecería de la región de Lima.

Los microorganismos utilizados en la industria enzimática y la industria farmacéutica están involucrados en la composición de sus productos, lo que hace que las industrias sean reacias a suministrar la biomasa residual. El suministro de *S. cerevisiae* como residuos de desecho es básicamente estable y se considera seguro (Farhan & Khadom, 2015). La levadura en forma muerta, fue recogida de una planta industrial de cerveza ubicada en Ate (Lima). En la investigación de Zhao et al. (2015) determinaron que los mecanismos de adsorción de Ag (I) de su levadura de desecho fueron: intercambio iónico, quelación y oxido-reducción por protones activos en los grupos funcionales durante el proceso de adsorción. El resultado de la levadura de desecho obtenida en la presente investigación fue la menos eficaz, no removiéndose Pb y Cd, lo cual es muy probable a la afinidad del Cd²⁺ hacia la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, siendo esta más sensible con otros iones metálicos y es más probable que la adsorción sea más compleja debido al aumento en la concentración de las otras especies químicas presentes en la solución interfieren en el proceso, además la presencia de co-iones electrolíticos también interfieren en la adsorción de Cd²⁺ en la misma (Rodríguez et al., 2008). El agua de la matriz 3 fue agua del ACR Humedales de Ventanilla y su composición fue: Pb, Cd y otros metales pesados tales como cobre, selenio, zinc, talio, níquel que pudieron afectar la eficacia de la levadura residual cervecera muerta. En la Tabla 15 se ilustran los pesos recuperados para las 3 matrices estructurales, obteniendo los valores más altos en gramos en recuperación de bioadsorbente en el proceso de filtrado posterior al proceso de adsorción, correspondientes a *Candida guilliermondii*.

4.9 Matriz experimental 4: Modelamiento con biomasa de levadura muerta para la determinación de un modelo ajustado según Langmuir y/o Freundlich:

En la Tabla 16 se describe las características de la matriz experimental 4:

Tabla 16: Características del modelamiento con biomasa muerta para la determinación del modelo que representa el proceso de remoción de Pb en presencia de Cd.

Matriz 4 modelamiento con biomasa (= Levadura muerta): determinar un modelo ajustado según Langmuir / Freundlich:
5×3 matraces = 3 réplicas con 100 ml suspensión ACR -HV regulado a [Pb] = 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 1.0 mg/L [Cd] = 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 y 0.1 mg/L 5 g _{MS} /L de biosorbente a 30 °C y 150 rpm durante 4 h. Luego una muestra de cada matraz. Centrifugación: Pesado de la fase sólida y análisis por ICP-masas de la muestra líquida. Modelamiento y ajuste (Langmuir y/o Freundlich)

4.10 Resultados de matriz experimental 4

Los patrones de adsorción de Pb y adicionalmente Cd por biomazas muertas con granulometría D50 = 0.5 mm de *Saccharomyces cerevisiae* y D50 = 1mm de *Candida guilliermondii* respectivamente se describieron en las Figuras 22-25. El modelo isotérmico de Freundlich fue el que mejor se ajustó a los resultados obtenidos en el experimento para *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida guilliermondii* como levaduras muertas a 121 °C y secadas a 100°C.

La presente investigación reportó a *Candida guilliermondii* como una levadura nativa del ACR Humedales de Ventanilla con propiedades biosorbentes para Pb y adicionalmente para Cd, las cuales se describen en las gráficas de las isothermas de adsorción de las Figuras 22-25 determinándose el grado de adsorción de *Candida guilliermondii* el cual fue mayor a *Saccharomyces cerevisiae* respecto a la adsorción de Pb en presencia de Cd.

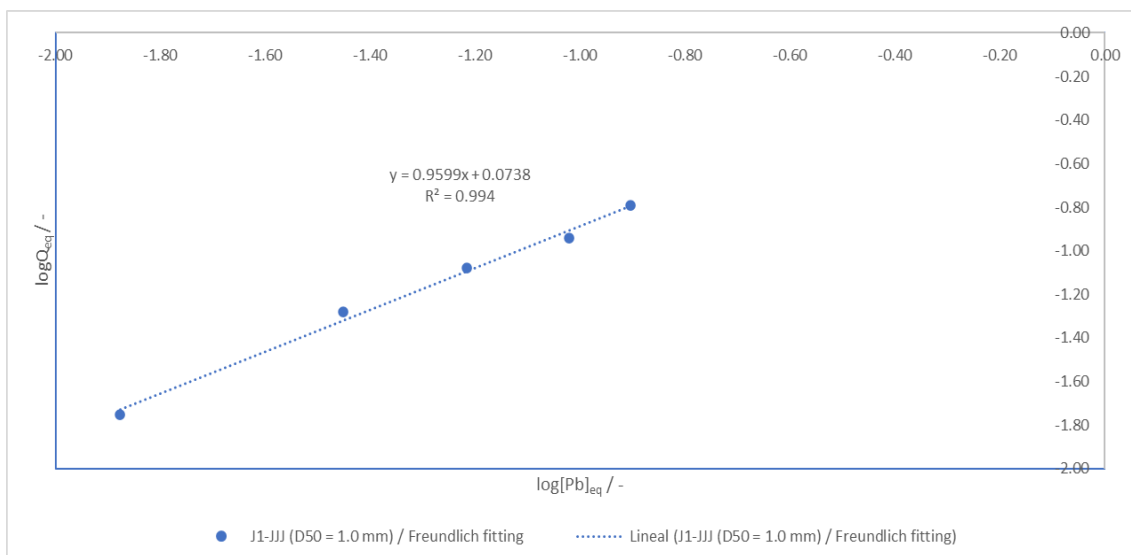


Figura 22: Ajuste de modelo de adsorción de Pb por biomasa muerta de *Candida guilliermondii*

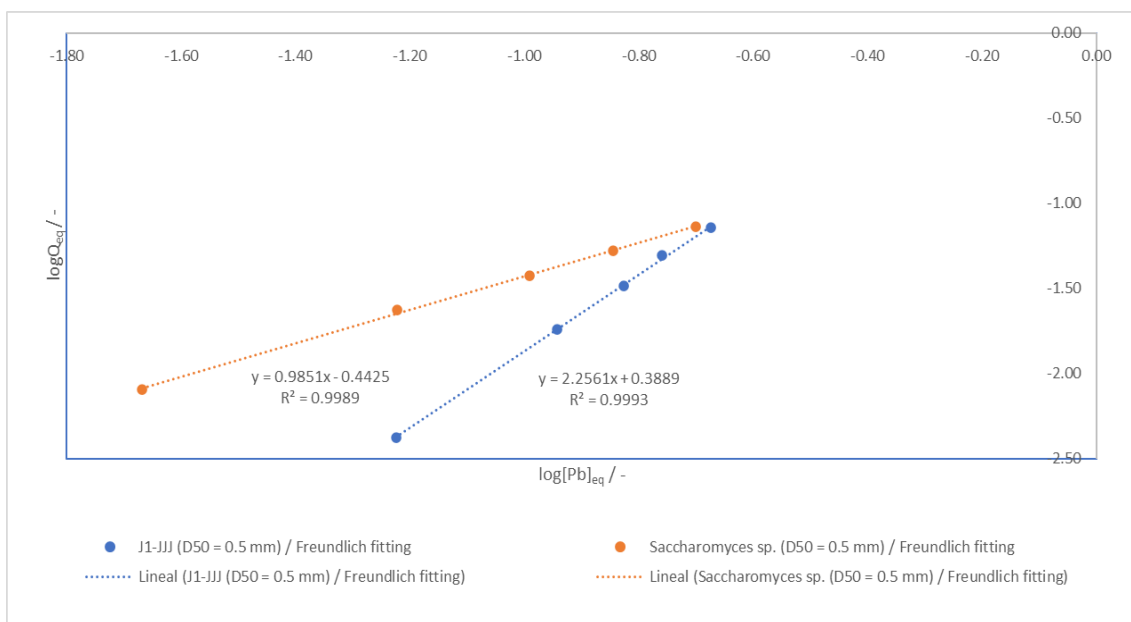


Figura 23: Ajuste de modelo de adsorción de Pb por biomasa muerta de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida guilliermondii*

Fuente. Fajardo & Wong, 2022

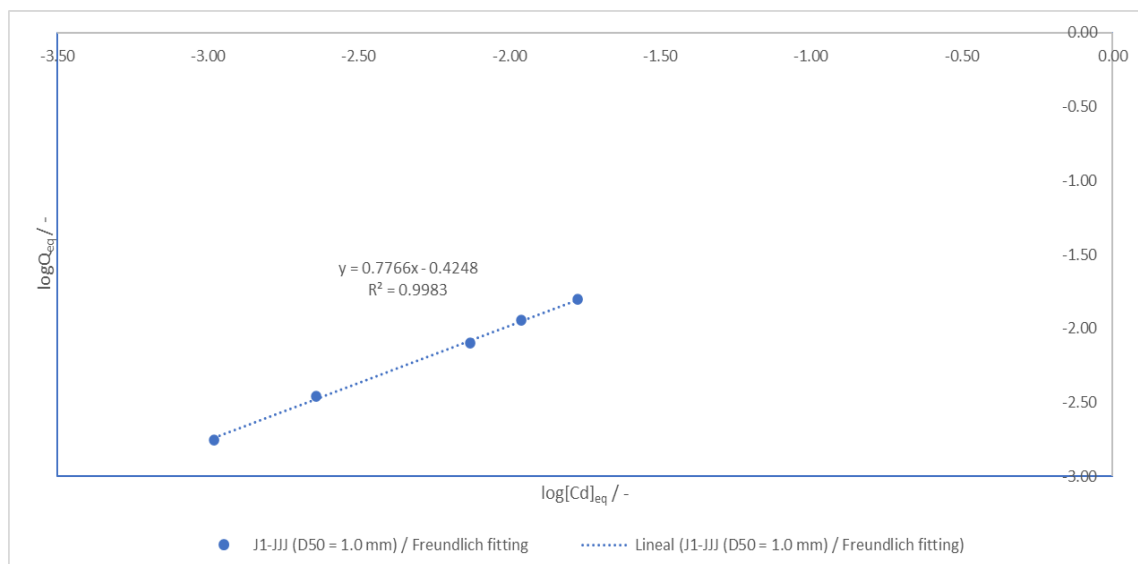


Figura 24: Ajuste de modelo de adsorción de Cd por biomasa muerta de *Candida guilliermondii*

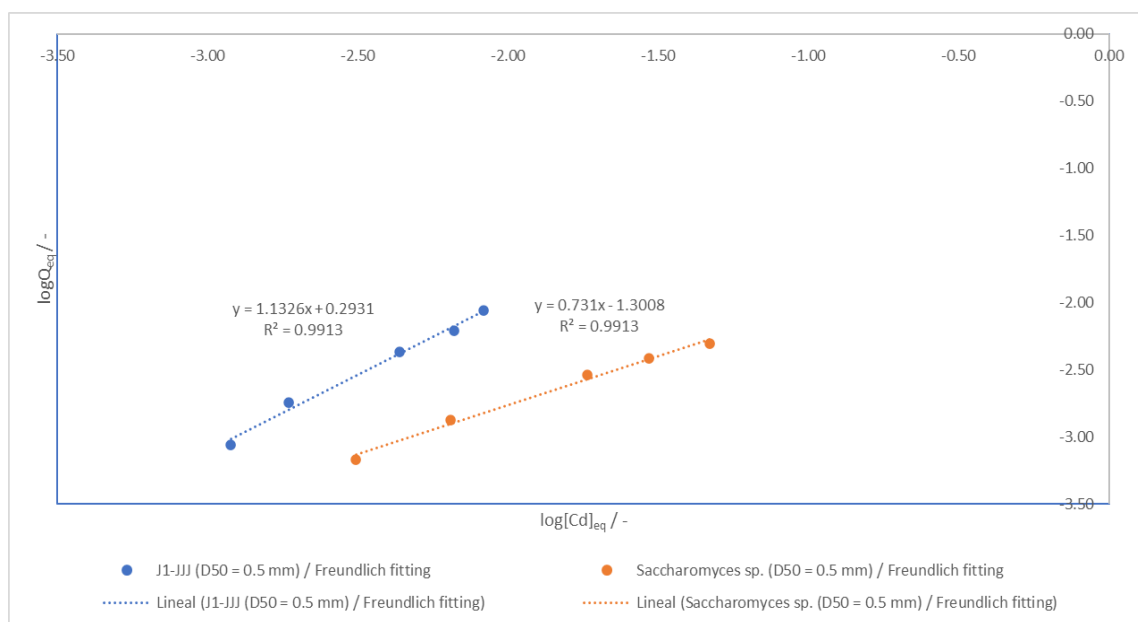


Figura 25: Ajuste de modelo de adsorción de Cd por biomasa muerta de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida guilliermondii*

Fuente. Fajardo & Wong, 2022

Los estudios de viabilidad para aplicaciones a gran escala que utilizan biomasa muerta son más aplicables que los procesos bioacumulativos que emplean microorganismos vivos, debido a que estos últimos requieren un suministro de nutrientes y un sistema biorreactor complejo. Además, el mantenimiento de una población microbiana saludable es difícil debido a la toxicidad de los contaminantes que se extraen y otros factores ambientales, tales como la temperatura y el pH de la solución. La recuperación de metales valiosos también está limitada en las células vivas, ya que se unen intracelularmente. Por estas razones, la atención se ha centrado en el uso de biomasa no viva como biosorbentes (Abbas et al., 2014).

En estudios llevados a cabo al respecto en *Saccharomyces cerevisiae* (Farhan & Khadom, 2015) se observó que la biosorción se incrementaba a medida que aumentaba la concentración inicial; lo que se atribuye a los sitios de unión activos disponibles para los iones de sorbato disponibles. La biosorción es muy rápida para todos los iones metálicos en los primeros 5 min, mientras que, durante el período de tiempo restante, las concentraciones de metales en el líquido continuaron disminuyendo y alcanzando un valor de concentración de equilibrio. En su estudio el comportamiento de sorción del biosorbente a diferentes dosis de 0.01 a 3 g/L en 10–100 mg/L de solución en condiciones optimizadas de pH y tiempo de contacto para el metal respectivo todos los iones metálicos mostraron un aumento en la eficiencia de eliminación y una disminución en la capacidad de biosorción al aumentar la biomasa de 0.01 a 0.1 g y este efecto disminuyó con un mayor incremento de la dosis de biomasa de 0.5 a 3 g.

En su modelo se eliminan más iones metálicos a dosis más altas debido a la disponibilidad de sitios más activos. Los datos que obtuvieron se ajustaron al modelo de isoterma de Freundlich, así como al de Langmuir, y por ello asumieron una distribución energética heterogénea de los sitios de unión activos en la biomasa, así como interacciones entre las moléculas adsorbidas, en su estudio la capacidad de absorción de Pb, Cd, cromo, cobre, cobalto y zinc aumenta al incrementar la concentración inicial de metal y disminuye al incrementar el peso del biosorbente.

4.11 Resultados de modelos cinéticos de sorción:

Tabla 17: Isotermas de adsorción

Microorganismo	D50	Constantes del modelo Freundlich (Pb)		Constantes del modelo Freundlich (Cd)	
<i>Candida guilliermondii</i> (J1-JJJ)	1.0 mm	K _f =	1.185	K _f =	0.376
		n =	1.042	n =	1.288
<i>Candida guilliermondii</i> (J1-JJJ)	0.5mm	K _f =	2.448	K _f =	1.964
		n =	0.443	n =	0.883
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.5mm	K _f =	0.361	K _f =	0.050
		n =	1.015	n =	1.368

En la matriz experimental 4 presentada en la Tabla 16, se evaluó un sistema con combinaciones de Pb y Cd en el C1 (0.1 mg/l de Pb con 0.01 mg/L de Cd), C2 (0.3 mg/l de Pb con 0.03 mg/L de Cd), C3 (0.5 mg/l de Pb con 0.05 mg/L de Cd), C4 (0.7 mg/l de Pb con 0.07 mg/L de Cd) y C5 (1.0 mg/l de Pb con 0.1 mg/L de Cd), *Candida guilliermondii* se evaluó con granulometría D50 1 mm con 0.5 gr como bioadsorbente y D50 0.5 mm como 1 gramo de bioadsorbente y *Saccharomyces cerevisiae* D50 0.5 mm como 1 gramo de bioadsorbente en matraces de 250 ml con 100 ml de agua del ACR Humedales de Ventanilla, en un diseño experimental con tres repeticiones obteniéndose los mejores resultados de remoción con *Candida guilliermondii* D50 1 mm con 0.5 gramos de bioadsorbente por matraz con 100 ml de agua de humedal analizado a las 4 horas fue marcado el resultado de remoción de Pb en las 5 concentraciones de los controles, obteniéndose un resultado óptimo en la remoción de Pb por *Candida guilliermondii* D50 1 mm con 0.5g de sorbato inicial en los controles de 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 0.9 mg/L de Pb para la bioadsorción (ver Tablas 18 - 20).

En la investigación de Vimala & Das (2009) confirmaron la efectividad de los hongos (Ostra (*Ornitorrinco Pleurotus*), champiñón (*Agaricus bisporus*) y champiñón lechoso (*Calocybe indica*)) como biosorbente de metales pesados, a través del efecto de parámetros como: el pH, la dosis de biomasa, el tiempo de contacto y la concentración

inicial de iones metálicos durante el proceso de biosorción. Determinándose que el valor de pH requerido para la biosorción fue 6.0 para Cd y 5.0 para Pb, respectivamente para los hongos en estudio. Las dosis más elevadas de biosorbente, obtuvieron un mayor porcentaje de eliminación de Cd (II) y Pb (II) debido a la abundante disponibilidad de sitios de sorción e intercambio iónico, en la presente investigación en la matriz 4 se evaluó el sistema a pH 6 y coincide con una buena bioadsorción de Cd al mismo pH en las concentraciones elevadas de Cd como levadura muerta con granulometría D50 0.5 mm con 1 gramo de bioadsorbente.

Montalvo et al. (2022) menciona que el incremento en la cantidad de adsorbente tiene una contribución significativa a la eficiencia de remoción de contaminantes, ya que se incrementa la disponibilidad de sitios activos para la adsorción de sorbato.

En la presente investigación se reporta una eficacia alta en remoción de Pb a pH 6 con *Candida guilliermondii* D50 1 mm con 0.5 g de bioadsorbente. Los valores de recuperación de pesos de los bioadsorbentes después del proceso de remoción se reportaron en las Tablas 21 y 22.

En la Figura 26 se observa el proceso de trabajo realizado con los filtros para determinar el peso recuperado de adsorbente después de finalizado el sistema de la matriz experimental 4.

Debido a los resultados de remoción como levadura activa, inactivada y muerta *Candida guilliermondii* se presenta como una levadura nativa con potencial de remoción de Pb y adicionalmente Cd para el ecosistema ACR Humedales de Ventanilla.

Tabla 18: Porcentajes de remoción R de Pb en presencia de Cd para *Candida guilliermondii* muerta a 121 °C y secada a 100°C en agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla con 0.5 g de sorbato inicial.

J1-JJJ	Controles	[Pb]o (mg/l)	[Cd]o (mg/l)	D50	[Pb]f (mg/l)	[Cd]f (mg/l)	([Cf-Co]/Co)	([Cf-Co]/Co)
							*100	*100
							[Pb] R (%)	[Cd] R (%)
0.5 g	C1	0.1020	0.00993	1.00	0.0122	0.00093	88.04	90.63
0.5 g	C1	0.1020	0.00993	1.00	0.0140	0.00110	86.27	88.92
0.5 g	C1	0.1020	0.00993	1.00	0.0136	0.00111	86.67	88.82
0.5 g	C2	0.2971	0.01983	1.00	0.0356	0.00238	88.02	88.00
0.5 g	C2	0.2971	0.01983	1.00	0.0358	0.00225	87.95	88.65
0.5 g	C2	0.2971	0.01983	1.00	0.0344	0.00221	88.42	88.86
0.5 g	C3	0.4768	0.04721	1.00	0.0626	0.00796	86.87	83.14
0.5 g	C3	0.4768	0.04721	1.00	0.0604	0.00735	87.33	84.43
0.5 g	C3	0.4768	0.04721	1.00	0.0596	0.00686	87.50	85.47
0.5 g	C4	0.6695	0.06809	1.00	0.0934	0.01119	86.05	83.57
0.5 g	C4	0.6695	0.06809	1.00	0.0909	0.01049	86.42	84.59
0.5 g	C4	0.6695	0.06809	1.00	0.1011	0.01113	84.90	83.65
0.5 g	C5	0.9327	0.09607	1.00	0.1244	0.01759	86.66	81.69
0.5 g	C5	0.9327	0.09607	1.00	0.1254	0.01691	86.56	82.40
0.5 g	C5	0.9327	0.09607	1.00	0.1243	0.01603	86.67	83.31

Tabla 19: Porcentajes de remoción R de Pb en presencia de Cd para *Candida guilliermondii* muerta a 121 °C y secada a 100°C en agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla con 1 g de sorbato inicial.

J1-JJJ	Controles	[Pb]o (mg/l)	[Cd]o (mg/l)	D50	[Pb]f (mg/l)	[Cd]f (mg/l)	[(Cf-Co)/Co] *100	[(Cf-Co)/Co] *100
							[Pb] R (%)	[Cd] R (%)
1 g	C1	0.1020	0.00993	0.50	0.0586	0.00117	42.55	88.22
1 g	C1	0.1020	0.00993	0.50	0.0572	0.00122	43.92	87.71
1 g	C1	0.1020	0.00993	0.50	0.0632	0.00119	38.04	88.02
1 g	C2	0.2971	0.01983	0.50	0.1203	0.00188	59.51	90.52
1 g	C2	0.2971	0.01983	0.50	0.1166	0.00189	60.75	90.47
1 g	C2	0.2971	0.01983	0.50	0.1059	0.00183	64.36	90.77
1 g	C3	0.4768	0.04721	0.50	0.1379	0.00479	71.08	89.85
1 g	C3	0.4768	0.04721	0.50	0.1592	0.00417	66.61	91.17
1 g	C3	0.4768	0.04721	0.50	0.1501	0.00405	68.52	91.42
1 g	C4	0.6695	0.06809	0.50	0.1627	0.00653	75.70	90.41
1 g	C4	0.6695	0.06809	0.50	0.1678	0.00667	74.94	90.20
1 g	C4	0.6695	0.06809	0.50	0.1908	0.00656	71.50	90.37
1 g	C5	0.9327	0.09607	0.50	0.1931	0.00851	79.30	91.14
1 g	C5	0.9327	0.09607	0.50	0.2189	0.00826	76.53	91.40
1 g	C5	0.9327	0.09607	0.50	0.2237	0.00810	76.02	91.57

Tabla 20: Porcentajes de remoción R de Pb en presencia de Cd para *Saccharomyces cerevisiae* muerta a 121 °C y secada a 100°C en agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla con 1 g de sorbato inicial.

<i>Saccharomyces</i>	Controles	[Pb] _o (mg/l)	[Cd] _o (mg/l)	D50	[Pb] _f (mg/l)	[Cd] _f (mg/l)	[(Cf-Co)/Co] *100	[(Cf-Co)/Co] *100
							[Pb] R (%)	[Cd] R (%)
1 g	C1	0.1020	0.00993	0.50	0.0212	0.00306	79.22	69.18
1 g	C1	0.1020	0.00993	0.50	0.0223	0.00310	78.14	68.78
1 g	C1	0.1020	0.00993	0.50	0.0210	0.00320	79.41	67.77
1 g	C2	0.2971	0.01983	0.50	0.0612	0.00658	79.40	66.82
1 g	C2	0.2971	0.01983	0.50	0.0600	0.00638	79.80	67.83
1 g	C2	0.2971	0.01983	0.50	0.0586	0.00633	80.28	68.08
1 g	C3	0.4768	0.04721	0.50	0.1007	0.01859	78.88	60.62
1 g	C3	0.4768	0.04721	0.50	0.1031	0.01824	78.38	61.36
1 g	C3	0.4768	0.04721	0.50	0.1020	0.01807	78.61	61.72
1 g	C4	0.6695	0.06809	0.50	0.1515	0.02943	77.37	56.78
1 g	C4	0.6695	0.06809	0.50	0.1371	0.02909	79.52	57.28
1 g	C4	0.6695	0.06809	0.50	0.1407	0.02977	78.98	56.28
1 g	C5	0.9327	0.09607	0.50	0.2011	0.04751	78.44	50.55
1 g	C5	0.9327	0.09607	0.50	0.2002	0.04681	78.54	51.28
1 g	C5	0.9327	0.09607	0.50	0.1960	0.04615	78.99	51.96

Tabla 21: Pesos recuperados del bioadsorbente después del proceso de remoción de Pb en presencia de Cd para biomasa de *Candida guilliermondii* muerta a 121 °C y secada a 100°C en agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla con 0.5 g de sorbato inicial.

Muestras	Controles		J1-JJJ inactivada D50 Tamiz 18		
	Pb	Cd	Peso inicial filtro (g)	Peso final filtro (g)	Peso recuperado (g)
A	0.1020	0.00993	1.1017	1.5481	0.4464
B	0.1020	0.00993	1.1078	1.5879	0.4801
C	0.1020	0.00993	1.1131	1.5837	0.4706
	Promedio		1.1075	1.5732	0.4657
A	0.2971	0.01983	1.1182	1.5955	0.4773
B	0.2971	0.01983	1.1509	1.6222	0.4713
C	0.2971	0.01983	1.1613	1.6276	0.4663
	Promedio		1.1435	1.6151	0.4716
A	0.4768	0.04721	1.1362	1.6291	0.4929
B	0.4768	0.04721	1.1332	1.6110	0.4778
C	0.4768	0.04721	1.1223	1.6138	0.4915
	Promedio		1.1306	1.6180	0.4874
A	0.6695	0.06809	1.0943	1.5755	0.4812
B	0.6695	0.06809	1.0971	1.5826	0.4855
C	0.6695	0.06809	1.0990	1.5821	0.4831
	Promedio		1.0968	1.5801	0.4833
A	0.9327	0.09607	1.0873	1.5681	0.4808
B	0.9327	0.09607	1.0926	1.5890	0.4964
C	0.9327	0.09607	1.0770	1.5700	0.4930
	Promedio		1.0856	1.5757	0.4901

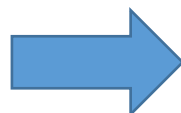
Peso recuperado: Peso de bioadsorbente filtrado, secado y pesado después del proceso de remoción.

Tabla 22: Pesos recuperados del bioadsorbente después del proceso de remoción de Pb en presencia de Cd para biomasa de *Candida guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae* muertas a 121 °C y secadas a 100°C en agua procedente del ACR Humedales de Ventanilla con 1 g de sorbato inicial.

Muestras	Controles		J1-JJJ inactivada D50 Tamiz 35			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D50 Tamiz 35		
	Pb	Cd	Peso inicial filtro (g)	Peso final filtro (g)	Peso recuperado (g)	Peso inicial filtro (g)	Peso final filtro (g)	Peso recuperado (g)
A	0.1020	0.00993	1.1225	2.0890	0.9665	1.1234	1.9727	0.8493
B	0.1020	0.00993	1.1263	2.0788	0.9525	1.1131	1.9531	0.8400
C	0.1020	0.00993	1.1271	2.0563	0.9292	1.1160	1.9639	0.8479
	Promedio		1.1253	2.0747	0.9494	1.1175	1.9632	0.8457
A	0.2971	0.01983	1.1205	2.0508	0.9303	1.1102	1.9627	0.8525
B	0.2971	0.01983	1.1218	2.0380	0.9162	1.1255	1.9684	0.8429
C	0.2971	0.01983	1.1116	2.0437	0.9321	1.1448	1.9823	0.8375
	Promedio		1.1180	2.0442	0.9262	1.1268	1.9711	0.8443
A	0.4768	0.04721	1.1306	2.0476	0.9170	1.0655	1.8870	0.8215
B	0.4768	0.04721	1.1377	2.0307	0.8930	1.0762	1.9188	0.8426
C	0.4768	0.04721	1.1423	2.0249	0.8826	1.0692	1.9049	0.8357
	Promedio		1.1369	2.0344	0.8975	1.0703	1.9036	0.8333
A	0.6695	0.06809	1.0890	1.9007	0.8117	1.0863	1.9442	0.8579
B	0.6695	0.06809	1.0934	1.9896	0.8962	1.0850	1.9568	0.8718
C	0.6695	0.06809	1.0948	1.9374	0.8426	1.0839	1.9155	0.8316
	Promedio		1.0924	1.9426	0.8502	1.0851	1.9388	0.8538
A	0.9327	0.09607	1.1179	1.9440	0.8261	1.1004	1.9176	0.8172
B	0.9327	0.09607	1.1232	1.9185	0.7953	1.0947	1.9383	0.8436
C	0.9327	0.09607	1.1307	1.9089	0.7782	1.0989	1.9031	0.8042
	Promedio		1.1239	1.9238	0.7999	1.0980	1.9197	0.8217



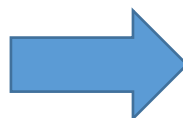
1. Instalación del sistema de trabajo



2. Filtrado de muestras



3. Preparación del sistema para secado en estufa



4. Pesado de la muestra final

Figura 26: Proceso de trabajo con los filtros

CONCLUSIONES

1. El presente estudio ha determinado la presencia de Pb y otros metales pesados incluyendo Cd en los cuerpos de agua superficial y en las dos estaciones de agua subterráneas M-16 y M-17 del ACR Humedales de Ventanilla en los años 2019 y 2020; el metal pesado más crítico en el ecosistema fue el Pb con un valor máximo de 0.3644 mg/L en la estación M-10 y las estaciones de muestreo más afectadas con Pb y adicionalmente Cd fueron las establecidas en el espejo rojo M-10 (J2), en el piezómetro M-17 (J1), en la zona de amortiguamiento “Cañaveral” M-4 (J3), en Canal Cerco M-5 (J4), en Filtro de agua M-1 (J5) y en Pisciplaya 2 M-15 (J6).
2. Se aislaron 9 levaduras nativas del ACR Humedales de Ventanilla pertenecientes a las especies *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus humicola*.
3. Las pruebas de tolerancia a diferentes concentraciones de Pb permitieron evaluar las 9 levaduras aisladas en tolerancia y tiempo de crecimiento, determinándose que algunas son de crecimiento lento y tolerancia elevada a Pb como *Cryptococcus laurentii* (cepa J3-JJJ); mientras que *Candida guilliermondii* (J1-JJJ) presentó tolerancias a concentraciones elevadas de Pb y un crecimiento más rápido a pH 5 y 6, característica que permitió evaluarla en un diseño experimental de optimización. La levadura optima en remoción de Pb fue *Candida guilliermondii* aislada del piezómetro M-17 (agua subterránea). Esta levadura fue la que presento mejores resultados de tolerancia a diferentes concentraciones de Pb, y sus resultados de remoción en Pb son muy similares a las obtenidas por *Saccharomyces cerevisiae* (levadura referente) evaluadas como levaduras activas en un diseño experimental de remoción Pb con 3 repeticiones (Matriz experimental 1).
4. Mediante el diseño experimental se logró optimizar los valores de las variables (a) granulometría – de gran importancia además para las operaciones unitarias aguas abajo (downstream) de separación – y (b) tiempo de operación, para el tratamiento de remoción de Pb. Considerando un objetivo de remoción de Pb, se puede comprobar que una granulometría D50 entre 0.5 mm y 1 mm están en rango

óptimo para una eficiente carga de adsorción por el adsorbente. Y en relación al tiempo de operación, se pudo comprobar que el valor de 2 h y hasta 4 h como máximo es óptimo para una adsorción que resulta en una correspondiente carga máxima (saturación) de la matriz estructural adsorbente empleada a nivel de laboratorio.

5. La levadura *Candida guilliermondii* como biomasa muerta de levadura aplicada en la remoción de Pb evidencia su potencial en biorremediación de humedales costeros. Se comprobó una alta eficiencia de adsorción mediante la aplicación de un sistema de biomasa muerta de levadura nativa (*Candida guilliermondii*) obteniéndose un adecuado ajuste matemático de dicho sistema de adsorción a un modelo de Freundlich (multicapa). Asimismo, en base a las matrices de diseño experimental llevadas a cabo se comprobó la significancia de los parámetros (1) granulometría, (2) tipo de biomasa (levadura nativa frente a comercial), (3) tipo y tratamiento de matriz estructural de biomasa, así como (4) actividad (viva) o inactividad (muerta) de biomasa en el proceso de adsorción. A partir de los resultados de concentración final de metales pesados obtenidos del diseño central compuesto (CCD) aplicado en la matriz estructural compuesta por *Saccharomyces cerevisiae* (cepa referencial-comercial) con tierra de diatomea (soporte de sílice) como patrón referente en el modelado, se puede concluir que el valor p de la variable granulometría D50 para un nivel de significancia de 0.05 (i.e. 95% confiabilidad) no supera el valor 0.028 para la función concentración de Pb (para hasta 4 h de operación), considerando el término lineal que es el de mayor efecto del modelo. Se concluye asimismo que la variable D50 tiene un efecto mayor que las variables concentración inicial de metal pesado $[Pb]_0$, lo cual abre una promisoriosa perspectiva para tratamiento de sistemas altamente contaminados con Pb. Asimismo, en la matriz experimental 3 donde se evaluó las granulometrías prometedoras del modelado en *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida guilliermondii* la variable D50 tuvo un efecto mayor que las variables concentración inicial de metal pesado $[Pb]_0$ en un sistema evaluado con agua proveniente del ACR Humedales de Ventanilla.
6. Respondiendo al objetivo general: Las levaduras *Candida guilliermondii* (J1-JJJ) y *Saccharomyces cerevisiae* como levaduras muertas con capacidad de remoción

de Pb presentaron resultados similares en las 3 primeras horas de evaluación. Sin embargo, la capacidad de carga del adsorbente *Candida guilliermondii* tiende a igualar y/o ser mayor que la capacidad de carga del adsorbente *Saccharomyces cerevisiae* a medida que la concentración de Pb en el agua se incrementa. Esto le da al adsorbente *Candida guilliermondii* una mayor eficiencia comparativa y una potencial aplicación a escala en sistemas altamente contaminados con Pb (que excedan los límites ECA).

RECOMENDACIONES

- Se recomienda el aislamiento de levaduras de aguas subterráneas en los ecosistemas de humedales costeros afectados por metales pesados considerando datos de campo con una periodicidad de 2 años a fin de explorar posibles aplicaciones en biorremediación con levaduras nativas en los ecosistemas afectados.
- Evaluar un sistema multicomponente (levadura, alga) para determinar el funcionamiento de un consorcio microbiano en el ecosistema ACR Humedales de Ventanilla.
- Difundir los resultados de la presente tesis con los grupos de interés como Gobierno Regional del Callao, Ministerio del Medio Ambiente y Diresa Callao a través de las Unidades de Responsabilidad social y proyección social de la UNMSM.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbas, S; Ismail, I.; Mostafa, T.& Sulaymon, A. (2014). Biosorption of heavy metals: A review. *Journal of Chemical Science and Technology*,3 (4), 74 – 102.
- Ademorati, C. (1996). Pollution by heavy metals. *Environmental Chemistry and Toxicology*, Foludex press Ibadan, 171-172.
- Aguinaga, O; McMahon, A.; White, K.; Dean, A. & Pittman, J. (2018). Microbial community shifts in response to acid mine drainage pollution within a natural wetland ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-14.
- Ahluwalia, S., & Goyal, D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 98(12), 2243-2257.
- Akpomie, G.; Ogbu, I.; Osunkunle, A.; Abuh, M. & Abonyi, M. (2012). Equilibrium isotherm studies on the sorption of Pb (II) from solution by Ehandiagu Clay. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*, 3(2), 357-358.
- Alegre, A. & Gutiérrez, S. (2021). Remoción de Cd y Pb en un efluente minero de Ticampa-Recuay, Ancash con biomasa seca de *Serratia marcescens* M8a-2T, 82(2), 336-345.
- Arief, V.; Trilestari, K.; Sunarso, J.; Indraswati, N.; & Ismadji, S. (2008). Recent progress on biosorption of heavy metals from liquids using low cost biosorbents: characterization, biosorption parameters and mechanism studies. *Clean*, 36(12), 937-962.
- Arrieta Aquise, L., & Sánchez Tito L. (2019). *Biosorción de metales pesados por hongos filamentosos, aislados de cuerpos de agua altoandinos contaminados con relaves mineros de la sierra central del Perú*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

- Azubuike, C.; Chikere C.; Okpokwasili G. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 180.
- Barclay, W.; Meager, K. & Abril, J. (1994) Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 6(2), 123–129.
- Bezerra, M.; Santelli, R.; Oliveira, E.; Villar, L. & Escaleira, L. (2008). Metodología de superficie de respuesta (RSM) como herramienta de optimización en química analítica. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Blagojev, N.; Vasic, V., Kukic, D; Sciban, M., Prodanovic, J. & Bera, O. (2021). Modelling and efficiency evaluation of the continuous biosorption of Cu (II) and Cr (VI) from wáter by agricultural waste materials. *Journal of Environmental Mangement*, 1 – 8
- Campaña, J.; Portero, P.; Martín, P. & Carvajal, E. (2019), Ecuadorian yeast species as microbial particles for Cr (VI) biosorption. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 28162-28172.
- Chandra, N., Nishadh, K. & Azeez, P. (2010). Monitoring water quality of Coimbatore wetlands. *Environmental Monitoring and Assessment*, 169, 671-676.
- De Rossi, A. (2018). Chromium (VI) biosorption by *Saccharomyces cerevisiae* subjected to chemical and termal treatments. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 19179-19186.
- De Silóniz, M.; Balsalobre, L.; Alba, C.; Valderrama, M.; Peinado, J. (2002). Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. *Research in Microbiology*, 153, 173-180.

- Dhankhar, R., & Hooda, A. (2011). Fungal biosorption - an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environmental Technology*, 32(5), 467-491.
- Ducey, T.; Sigua, G.; Novak, J.; Ippolito, J.; Spokas, K. & Johnson, M. (2021). Microbial response to phytostabilization in mining impacted soils using maize in conjunction with biochar and compost. *Microorganisms*, 9, 1-16.
- Dutta, A.; Zhou, L.; Castillo, C.; De Herdt, E. (2015). Cadmium (II), lead (II), and copper (II) biosorption on baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Journal of Environmental Engineering*, 142(9), 1-7.
- Fajardo, N., Solís, H. y Gil, F. (2017). Determinación de metales pesados en los cuerpos de agua del Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla, Región Callao, Perú. *Revista del Instituto de Investigación, FIGMMG-UNMSM*, 20(39), 149-158.
- Fajardo, N. & Wong, J. (2022). Lead and cadmium removal with native yeast from coastal wetlands. *Open Chemistry*, 20, 1096-1109.
- Farhan, S. & Khadom, A. (2015). Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Industrial Chemistry*, 6, 119-130.
- Fazli, M.; Soleimani, N.; Mehrasbi, M.; Darabian, S.; Mohammadi, J. & Ramazani, A. (2015). Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13(19), 1-9.
- Ferdous, A.; Maisha, N.; Sultana, N. & Ahmed, S. (2016). Removal of heavy metal from industrial effluents using Baker's yeast. *American Institute of Physics*, 1754(1), 1-6.
- Fomina, M. & Gadd, G. (2014). Biosorption: current perspectives on concept, definition and application, *Bioresource Technology*, 160, 3-14.

- Freundlich, H. (1926). Adsorption in solution, *Physical Chemistry*, 58, 384–410.
- Gadd, G. (2008). Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(1), 13-28.
- Gavrilescu, M. (2004). Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Engineering Life Sciences*, 3, 219–232.
- Gobierno Regional del Callao-GRC. (2009). Plan Maestro 2009-2014 del Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla. *Gobierno Regional del Callao*.
- Goel, J.; Kadirvelu, K.; Rajagopal, C. & Garg, V. (2005). Removal of lead (II) by adsorption using treated granular activated carbon: batch and column studies. *Journal of Hazardous Materials*, 125, 211–220.
- Hlihor, R. & Gavrilescu, M. (2009). Removal of some environmentally relevant heavy metals using low-cost natural sorbents. *Environmental Engineering and Management Journal*, 8, 353–372.
- Hlihor, R.; Bulgariu, L.; Sobariu, D.; Diaconu, M.; Tavares, T. & Gavrilescu, M. (2014). Recent advances in biosorption of heavy metals: support tools for biosorption equilibrium, kinetics and mechanism. *Revue Roumaine de Chimie*, 59(6-7), 527-538
- Hlihor, R.; Rosca, M.; Tavares, T. & Gavrilescu, M. (2017). The role of *Arthrobacter viscosus* in the removal of Pb (II) from aqueous solutions. *Water Science & Technology*, 76(7), 1726 – 1738.
- Igiri, B.; Okoduwa, S; Idoko, G.; Akabuogu, E.; Adeyi, A. & Ejiogu, K. (2018). Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *Journal of Toxicology*, 2018, 1-16.

- Infante, C.; De Arco, D. & Angulo, E. (2014). Remoción de Pb, mercurio y níquel utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista MVZ Córdoba, 19(2), 4141-4149.
- Joo, G.; Lee, W. & Choi, Y. (2021). Heavy metal adsorption capacity of powdered *Chlorella vulgaris* biosorbent: effect of chemical modification and growth media. Environmental Science and Pollution Research, 28, 25390 – 25399.
- Kasuya, M.; Teranishi, H.; Aohima, K.; Katoh, T.; Horiguchi, N.; Morikawa, Y.; Nishijo, M. & Iwata, K. (1992). Water pollution by cadmium and the onset of “itai-itai” disease. Water Sci. Technol., 25, 149-156.
- Kecili, R. & Mustansar, C. (2018). Chapter 4: Mechanism of Adsorption on Nanomaterials, in Nanomaterials in Chromatography Current Trends in Chromatographic Research Technology and Techniques, C. Mustansar, Ed., 89–115, Elsevier, Cambridge, United States.
- Klaassen, C. (2001). Heavy metals and Hardmen JG, Limbird LE, Gilman AG (eds). Goodman and Gilman's: The pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw Hill, New York, 1851-1875.
- Kotrba, P. (2011). Microbial biosorption of metals. Springer Science and Business media Editors. DOI 10.1007/978-94-007-0443-5.
- Kordialik, E. (2011). Cadmium and lead recovery from yeast biomass. Central European Journal of Chemistry, 9(2), 320-325.
- Langmuir, I. (1916), The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. solids, Journal of the American Chemical Society, 38(11), 2221–2295.
- Lazcano, C. (2014). Biotecnología Ambiental de Aguas y Aguas Residuales. (2da. Ed). Fondo Editorial UNMSM: Lima – Perú.

- Lavado, C.; Sun, M.; Castro, T. & Bonilla, H. (2020). Biosorción de Pb (II) en solución acuosa con biomasa de los cladodios de la tuna (*Opuntia ficus indica*). *Revista Colombiana de Química*, 49(3), 36-46.
- Li, Z. & Yuan, H. (2008). Responses of *Rhodotorula sp* Y11 to cadmium. *Biometals*, 21, 613-621.
- Lo, W.; Chua, H.; Lam, K. & Bi, S. (1999). A comparative investigation on the biosorption of lead by filamentous fungal biomass. *Chemosphere*, 39, 2723–2736.
- Machado, M.; Soares, E. & Soares, H. (2010). Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: chemical speciation as a tool in the prediction and improving of treatment efficiency of real electroplating effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 180(1), 347-353.
- Marques, M. & Pinheiro, H. (2000). pH effects on the removal of Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} from aqueous solution by waste brewery biomass. *Bioprocess Engineering*, 23, 135-141.
- Martin, T.D., Brockhoff, C.A., y Creed, J.T. (1994). Method 200.7: Determination of Metals and trace Elements in Water and Wates by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry. Environmental Protection Agency. Recuperado de: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_200-7_rev_4-4_1994.pdf
- Montalvo, J.; Reátegui, W.; Peña, A.; Zaldívar, W.; King, M.; Fernández, V.; Guerrero, J. & Puris, Jhon. (2022). Adsorption of Cd (II) using chemically modified rice husk: characterization, equilibrium, and kinetics studies. *Adsorption Science & Technology*, 2022, 1 – 17.
- Moreno, S. & Ramos, G. (2018). Descontaminación de arsénico, Cd y Pb en agua por biosorción con *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2), 51-68.

- Nacu, G.; Negrilă, L.; Roșca, M.; Smaranda, C. Bulgariu, L. & Gavrilesco, M. (2015). Efficient removal of Pb (II) ions from accidental polluted Waters by adsorption onto thermal activated lignin. The 5th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering.
- Oke, D.; Ndlovu, S. & Sibanda, V. (2014). Removal of platinum group metals from dilute process streams: Identification of influential factors using DOE approach. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2, 1061–1069.
- Oke, D.; Ndlovu, S. & Sibanda, V. (2017). Purification of a dilute platinum group metals process stream using waste yeast biomass immobilized on plaster of Paris. *The Journal of the Southern African Institute of Mining and Metallurgy*, 117, 757-763.
- Pande, V.; Chandra, S.; Sati, D.; Bhatt, P. & Samant, M. (2022). Microbial interventions in bioremediation of heavy metal contaminants in agroecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1-16.
- Papon, N.; Savini, V.; Lanoue, A.; Simkin, A.; Creche, J.; Giglioli, N.; Clastre, M.; Courdavault, V. & Sibirny, A. (2013). *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Current Genetics*, 59, 73-90.
- Pratish, A.; Kumar, A. & Hu, Z. (2018). Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review, *International Microbiology*, 21, 97-106.
- Rao, L. N., & Prabhakar, G. (2011). Removal of heavy metals by biosorption - an overall review. *Journal of Engineering Research and Studies*, 2(4), 17-22.
- Rasmussen, L.; Sørensen, S.; Turner, R. & Barkay, T. (2000). Application of a mer-lux biosensor for estimating bioavailable mercury in soil, *Soil Biology & Biochemistry*, 32(5), 639–646.

- Rehman, A. & Anjum, M. (2010). Multiple metal tolerance and biosorption of cadmium by *Candida tropicalis* isolated from industrial effluents: glutathione as detoxifying agent. *Environmental Monitoring and Assessment*, 174, 585-595.
- Rizwan, M.; Mujtaba, G.; Memon, S.; Lee, K. & Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 394–404.
- Rodríguez, M.; Miranda, R.; Olivas, R. & Sosa, C. (2008). Efecto de las condiciones de operación sobre la biosorción de Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cr^{3+} en solución por *Saccharomyces cerevisiae* residual. *Información Tecnológica*, 19(6), 47-55.
- Rojas, M. (2010). Situación actual y perspectivas turísticos de los humedales de Ventanilla-Callao. *Cultura*, 24, 1-20.
- Ross, I. & Townsley, C. (1986). The uptake of heavy metals by filamentous fungi. *Immobilization of Ions by Biosorption*. Eccles, H. and Hunt, S. (eds). IRL Press, Chichester, UK.
- Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P. & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278.
- Sahan, T. & Ozturk, D. (2014). Investigation of Pb (II) adsorption onto pumice samples: application of optimization method based on fractional factorial design and response Surface methodology. *Clean Technologies Environmental Policy*, 16, 819-831.
- Schumann, K. (1990). The toxicological estimation of the heavy metal content (Cd, Hg, Pb) in food for infants and small children, *Z. Ernährungswiss*, 29, 54-73.
- Silva, B.; Martins, M.; Rosca, M.; Rocha, V.; Lago, A.; Neves, I. & Tavares, T. (2019). Waste-based biosorbents as cost-effective alternatives to commercial adsorbents for the retention of fluoxetine from water. *Separation and Purification Technology*, 235,1-8.

- Simmons, P.; Singleton, I. (1996). A method to increase silver biosorption by an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 278–285.
- Soares, E. & Soares, H. (2012). Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology; a review, *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 1066–1083.
- Tayang, A. & Songachan, L. (2021). Microbial bioremediation of heavy metal. *Current Science*, 120(6), 1013-1025.
- Ting, Y. & Sun, G. (2000). Use of polyvinyl alcohol as a cell immobilization matrix for copper biosorption by yeast cells, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 75, 541–546.
- Togue, F. (2019). Modeling adsorption mechanism of paraquat onto Ayous (*Triplochiton scleroxylon*) wood sawdust, *Applied Water Science*, 9(1), 1–7.
- Van der Heggen, M.; Martins, S.; Flores, G. & Soares, E. (2010). Lead toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbial in Saccharomyces cerevisiae*, 88, 1355-1361.
- Veglio, F. & Beolchini, F. (1997). Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy*, 44, 301-316.
- Vimala, R. & Das, N. (2009). Biosorption of cadmium (II) and lead (II) from aqueous solutions using mushrooms: A comparative study. *Journal of Hazardous Materials*, 168, 376-382.
- Wang, J. & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances*, 24, 427-451.

- Wang, X.; Shan, T. & Pang, S. (2018). Phytoremediation potential of *Saccharina japonica* and *Sargassum horneri* (Phaeophyceae): Biosorption study of strontium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 101, 501-505.
- Webber, T. & Chakravarti, R. (1974). Pore and solid diffusion models for fixed-bed adsorbers. *American Institute of Chemical Engineers*, 20 (2), 228–238.
- West, T. (2016). A *Candida guilliermondii* lysine hyperproducer capable of elevated citric acid production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32, 73, 123-127.
- Wu, X.; Cobbina, S.; Mao, G.; Xu, Hai; Zhang, Z. & Yang, L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 8244-8259.
- Wysocki, R.; Chéry, C.; Wawrzycka, D.; Van Hulle, M.; Cornelis, R.; Thevelein, J.; & Tamás, M. (2001). The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 40(6), 1391-1401.
- Yuan, W.; Cheng, J.; Huang, H.; Xiong, S.; Gao, J.; Zhang, J. & Feng, S. (2019). Optimización de la biosorción de Cd por *Shewanella putrefaciens* utilizando un diseño de Box-Behnken. *Ecotoxicología y seguridad ambiental*, 175, 138-147.
- Zhang, H.; Liu, L.; Chang, Q.; Wang, H. & Yang, K. (2015). Biosorption of Cr (VI) ions from aqueous solutions by a newly isolated *Bosea sp.* Strain Zer-1 from soil samples of a refuse processing plant. *Canadian Journal of Microbiology*, 61, 399 – 408.
- Zhao, Y.; Wang, D.; Xie, H.; Wook, S.; Cui, L & Wu, G. (2015). Adsorption of Ag (I) from aqueous solution by waste yeast: kinetic, equilibrium and mechanism studies. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, 69-77.
- Zoghi, A.; Khosravi-Darani, K. & Sohrabvandi, S. (2014). Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(1), 84-98.

ANEXO 01: Artículo de investigación publicado

DE GRUYTER

Open Chemistry 2022; 20: 1096–1109



Research Article

Narda Fajardo Vidal*, Jorge Wong Dávila

Lead and cadmium removal with native yeast from coastal wetlands

<https://doi.org/10.1515/chem-2022-0211>
received July 9, 2022; accepted September 4, 2022

Abstract: Water bodies affected by heavy metals have been characterized in some natural ecosystems such as coastal wetlands in Peru. For this reason, in the present study, the determination of heavy metals lead (Pb), cadmium (Cd), and others was carried out in the water bodies of the Regional Conservation Area (RCA) Wetlands of Ventanilla using the Induction Coupled Plasma method. Water samples were collected at the six most critical stations for Pb and Cd, for the isolation of lead-tolerant microorganisms in 2022 with the aim of evaluating native microorganisms with removal potential of Pb and Cd. Yeasts such as *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus humicola*, and *Rhodotorula mucilaginosa* with tolerance to high concentrations of Pb were isolated. The yeast with the best Pb tolerance result was *Candida guilliermondii* isolated from groundwater (piezometer sampling J1); Pb sorption was conducted with active yeast (living biomass), whereas both Pb and Cd sorption were conducted with inactive yeast (dead biomass). The results were compared with those of a reference standard yeast strain *Saccharomyces cerevisiae*: the native yeast proved to have optimum behavior for the process.

Keywords: heavy metals, biosorption, yeast, wetland

1 Introduction

Wetlands are highly productive ecosystems that provide a number of services of significant value to mankind. Flood control, groundwater replenishment, sediment retention,

water purification, recreation, as well as climate change mitigation and adaptation, are just a few of the many valuable ecosystem services that wetlands provide [1].

Ecosystem services are natural assets produced by the environment and utilized by humans such as clean air, water, food, and materials and contribute to social and cultural well-being [2].

In developing countries like those in Latin America, the conservation of ecosystems is a critical issue. In Peru, the Regional Conservation Area (RCA) Wetlands of Ventanilla (located in the Callao Region) is one of many regional habitat conservation systems protected by the Peruvian Government through the Natural Resources and Environmental Management Office.

One of the problems faced by the RCA Wetlands of Ventanilla is the accumulation of heavy metals, particularly lead (Pb), and cadmium (Cd), in its water bodies; these metals can bioaccumulate in fish and affect birds through the food chain. In addition to these metals, there would be other sources of contamination in these wetlands, such as poorly disposed mining tailings deposits in the buffer zone of the RCA Wetlands of Ventanilla.

On the other hand, it is known that among the separation processes for the potential removal of heavy metals from water, adsorption/biosorption could represent a technically and economically feasible mechanism for the respective decontamination [3,4]. Moreover, several studies have shown that the structural matrix of particular biomass sources, including biomass from microorganisms, can translate into efficient systems for sorption of heavy metals [5–10]. Particularly interesting is the application of sustainable compounds from biomass such as yeast (active or inactive), in whose organic and molecular structure there are polysaccharides with sorbent capacity, in addition to having a network of functional chemical groups that can ultimately result in an efficient-capacity global yeast for heavy metal sorption.

With the goal of proposing an alternative that represents a balance between biological [11] and chemical engineering processes for the remediation of the wetlands in question, a study was carried out to (a) determine the presence of potential native yeast microorganisms in the

* Corresponding author: Narda Fajardo Vidal, Department of Bioprocesses, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, National University of San Marcos UNMSM, Calle Germán Amézaga 375, 15081 Lima, Peru, e-mail: narda.fajardo@unmsm.edu.pe
Jorge Wong Dávila: Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemical and Textile Engineering, National University of Engineering UNI, Av. Tupac Amaru 210, 15333 Lima, Peru

References

- [1] Verma M, Negandhi D. Valuing ecosystem services of wetlands a tool for effective policy formulation and poverty alleviation. *HSJ*. 2011;56(8):1622–39. doi: 10.1080/02626667.2011.631494
- [2] Maltby E, Acreman MC. Ecosystem services of wetlands: pathfinder for a new paradigm. *HSJ*. 2011;56(8):1341–59. doi: 10.1080/02626667.2011.631014
- [3] Fomina M, Gadd GM. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresour Technol*. 2014;160:3–14. doi: 10.1016/j.biortech.2013.12.102
- [4] Ramírez FI, Manzano T, García JC, Zhadan GG, Shnyrov VL, Kennedy JF, et al. Biosorption of heavy metals from acid mine drainage onto biopolymers (chitin and α (1,3) β -D-glucan) from industrial blowaste exhausted brewer's yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* L.). *Biotechnol Bioproc Eng*. 2011;16:1262–72. doi: 10.1007/s12257-010-0465-5
- [5] Montalvo-Andía J, Reátegui-Romero W, Peña-Contreras A, Zaldivar WF, King-Santos M, Fernández-Guzmán V, et al. Adsorption of Cd (II) using chemically modified rice husk: characterization, equilibrium, and kinetic studies. *Adsorp Sci Technol*. 2022;2022:1–17. doi: 10.1155/2022/3688155
- [6] Joo G, Lee W, Choi Y. Heavy metal adsorption capacity of powdered *Chlorella vulgaris* biosorbent: effect of chemical modification and growth media. *Environ Sci Pollut Res*. 2021;28:25390–9. doi: 10.1007/s11356-021-12396-w
- [7] Wang X, Shan T, Pang S. Phytoremediation Potential of *Saccharina japonica* and *Sargassum horneri* (Phaeophyceae): Biosorption Study of Strontium. *Bull Environ Contamin Toxicol*. 2018;101:501–5. doi: 10.1007/s00128-018-2435-0
- [8] Zhang H, Liu L, Chang Q, Wang H, Yang K. Biosorption of Cr(VI) ions from aqueous solutions by a newly isolated *Bosea* sp. strain Zer-1 from soil samples of a refuse processing plant. *Can J Microbiol*. 2015;61:399–408. doi: 10.1139/cjm-2014-0719
- [9] Campaña-Pérez J, Portero P, Martín-Ramos P, Carvajal EJ. Ecuadorian yeast species as microbial particles for Cr(VI) biosorption. *Environ Sci Pollut Res*. 2019;26:28162–72. doi: 10.1007/s11356-019-06035-8
- [10] Lavado-Meza C, Sun-Kou M, Castro-Arroyo T, Bonilla-Mancilla D. Biosorption of lead (II) in aqueous solution with biomass of prickly pear cladodes (*Opuntia ficus indica*). *Rev Colomb Quim*. 2020;49(3):36–46. doi: 10.15446/rcq.v49n3.85823
- [11] Aguinaga OE, McMahon A, White KN, Dean AP, Pittman JK. Microbial Community shifts in response to acid mine drainage pollution within a natural wetland ecosystem. *Front Microbiol*. 2018;9:1445. doi: 10.3389/fmicb.2018.01445
- [12] Fajardo N. Evaluación de la calidad microbiológica y fisicoquímica de las aguas en el área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla, región Callao, Perú. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM; 2018.
- [13] Sánchez T. Evaluación de resistencia y biosorción de metales pesados en levaduras nativas aisladas de lagunas altoandinas contaminadas con relaves mineros. Tesis para optar grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Lima, Perú: Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2020.
- [14] El-Sayed MT. Removal of lead (II) by *Saccharomyces cerevisiae* AUMC 3875. *Ann Microbiol*. 2013;63:1459–70. doi: 10.1007/s13213-013-0609-x
- [15] Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM-2017-MINAM. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua.
- [16] Papon N, Savini V, Lanoue A, Simkin AJ, Crèche J, Giglioli-Guilvarc'h N, et al. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Curr Genet*. 2013;59:73–90. doi: 10.1007/s00294-013-0391-0
- [17] Kordialik E. Cadmium and lead recovery from yeast biomass. *Open Chem*. 2011;9(2):320–5. doi: 10.2478/s11532-011-0001-2
- [18] Machado MD, Janssens S, Soares HM, Soares EV. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: advantages of using dead biomass. *J Appl Microbiol*. 2008;106:1792–804. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04170.x
- [19] De Rossi A, Rigon MR, Zapparoli M, Braido RD, Colla LM, Dotto GL, et al. Chromium (VI) biosorption by *Saccharomyces cerevisiae* subjected to chemical and thermal treatments. *Env Sci Pollut Res*. 2018;25:19179–86. doi: 10.1007/s11356-018-2377-4
- [20] Sampaio AC, Bezerra RMF, Dias AA. Mediterranean forested wetlands are yeast hotspots for bioremediation: a case study using azo dyes. *Sci Rep*. 2018;8:15943. doi: 10.1038/s41598-018-34325-7
- [21] Moreno SCy, Clamont GR. Descontaminación de arsénico, cadmio y plomo en agua por biosorción con *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP. Rev Especial Cienc Químico-Biológicas*. 2018;21(2):51–68. doi: 10.22201/fesz.23958723e.2018.0.155
- [22] Phu NV, Hai THT, Tuan AP, Tuan LC, Tien L, Kim CTN. Removal of Manganese and copper from aqueous solution by yeast *Papiliotrema huenov*. *Mycobiology*. 2021;49(5):507–20. doi: 10.1080/12298093.2021.1968624
- [23] Massoud R, Hadiani MR, Hamzehlou P, Khosravi-Darani P. Bioremediation of heavy metals in food industry: Application of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electron J Biotechnol*. 2019;37:56–60. doi: 10.1016/j.ejbt.2018.11.003

ANEXO 02: Permiso para la investigación del Gore Callao



Gobierno Regional
del Callao

24 NOV. 2020

"Año de la universalización de la salud"

Callao,

CARTA N° 153 -2020-GRC/GRRNGMA

Señorita

Mg. Biga. NARDA STELLA FAJARDO VIDAL
Estudiante del Doctorado en Ingeniería Química
Facultad de Química e Ingeniería Química
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Lima.-

Asunto: Autorización para actividades de investigación en el ACR
Humedales de Ventanilla.

Ref.: Carta S/N de la interesada (H.R. N° 011783).

De mi consideración:

Me es grato dirigirme a usted, dando atención a su documento de la referencia, mediante el cual solicita a esta gerencia regional la autorización para acceder al Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla (ACR Humedales de Ventanilla, D.S. N° 074-2006-AG), con la finalidad de realizar los monitoreos y muestreos necesarios para desarrollar su proyecto de investigación titulado "**Uso de Biomasa para la remoción de plomo disuelto de las aguas superficiales procedentes del ACR Humedales de Ventanilla**", requerido para la obtención del grado de Doctor en Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos - UNMSM.

En relación a ello, y basado en el informe del especialista de esta gerencia, se le **otorga** la Autorización de Ingreso (Acceso) al Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla, para realizar el proyecto de investigación "Uso de Biomasa para la remoción de plomo disuelto de las aguas superficiales procedentes del ACR Humedales de Ventanilla", desde enero de 2020 hasta diciembre de 2022, bajo el acompañamiento y supervisión del personal del área natural protegida.

Finalmente, saludamos su iniciativa e interés por desarrollar investigación científica en el ACR Humedales de Ventanilla, la misma que es de suma importancia para la gestión en conservación de la biodiversidad que el Gobierno Regional del Callao desarrolla en la zona, brindando valiosos insumos para la formulación de instrumentos de planificación y/o planes de acción relacionados.

Sin otro particular, me despido de usted, deseando éxitos en su proyecto de investigación y haciendo propicia la ocasión para expresarle los sentimientos de mi consideración.

Atentamente,

GOBIERNO REGIONAL DEL CALLAO

Gest. WENDY DE LA CRUZ CARHUAPOMA
Gerente Regional de Recursos Naturales
y Gestión del Medio Ambiente



GOBIERNO REGIONAL DEL CALLAO

INFORME N° 026-2020-GRC/GRRNGMA/RZR



A : **Geóg. WENDY JAZMIN DE LA CRUZ CARHUAPOMA**
Gerente Regional de Recursos Naturales y Gestión del M. Ambiente.

DE : **LIC. RAUL ZARATE RENDON**
Especialista de la GRRNGMA-OAPYMA.
Coordinador de la Actividad de Administración del ACRHV.

ASUNTO : Autorización para el desarrollo de actividades de investigación científica en el ACR Humedales de Ventanilla.

REF. : Carta S/N de la interesada (H.R. N° 011783).

FECHA : Callao, 23 de noviembre del 2020.

Tengo a bien dirigirme a usted, en atención al documento de la referencia, mediante el cual la Mg. Blga. Narda Stella Fajardo Vidal, estudiante de Doctorado de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, solicita autorización para desarrollar su proyecto de investigación titulado "Uso de Biomasa para la remoción de plomo disuelto de las aguas superficiales procedentes del ACR Humedales de Ventanilla", con la cual busca optar el grado de Doctor en Ingeniería Química.

Al respecto de la mencionada solicitud, lo siguiente:

ANTECEDENTES:

1. La solicitud ingresada está de acuerdo al procedimiento vigente (Procedimiento N° 68) en el Texto Único de Procedimientos Administrativos del Gobierno Regional del Callao, aprobado mediante Decreto Regional N° 00001, del 02 de enero de 2020, cumpliendo con los respectivos requisitos.
2. La investigadora interesada, Mg. Blga. Narda Stella Fajardo Vidal, realizó en el año 2015 una serie de muestreos de cuerpos de agua en el área natural protegida, como parte de su proyecto de investigación titulada "Evaluación de la Calidad Microbiológica y Fisicoquímica de las Aguas en el Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla, Región Callao, Perú", con la cual obtuvo su grado de Magister en Ciencias Ambientales con mención en Gestión y Control de la Contaminación. Además de ello, la bióloga Narda Fajardo es investigadora reconocida y colaboradora del ACR Humedales de Ventanilla desde el año 2013, participando como expositora en diversos eventos organizados por la Jefatura del área, como los cursos de niños guía y miniguardaparques.
3. La interesada acompaña su solicitud con su Plan de Investigación detallado, el mismo que abarca actividades de monitoreo en campo desde 2019 (preliminares) hasta el 2022, adjuntando también una Carta de Presentación de parte de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, que respalda académicamente la tesis. Se incluye también un Protocolo de Seguridad para los Muestreos, enmarcada en el contexto de Emergencia Sanitaria por la Pandemia por Covid-19.
4. Dadas las condiciones de distanciamiento social y otras restricciones relacionadas a la Declaratoria de Emergencia Sanitaria por la Pandemia por Covid-19, desde marzo del presente año, las actividades programadas para el desarrollo de la investigación en el





GOBIERNO REGIONAL DEL CALLAO

presente año, ha sufrido un retraso, quedando también el trámite de la autorización en pendiente.

5. La temática propuesta en la investigación presentada por la interesada, es una de gran interés para la gestión que realiza el Gobierno Regional del Callao como administrador del ACR Humedales de Ventanilla, en cuanto representa una interesante experiencia de biorremediación de espacios degradados por contaminación en el área natural protegida, fundamental para la formulación de instrumentos de gestión eficientes y para el alcance de los objetivos de creación del ACR con una mirada de desarrollo sostenible.

CONCLUSIONES:

1. Vistos los antecedentes, el suscrito recomienda autorizar a la Mg. Blga. Narda Stella Fajardo Vidal, estudiante de Doctorado de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para el ingreso (acceso) al Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla para realizar las actividades propias del proyecto de investigación "Uso de Biomasa para la remoción de plomo disuelto de las aguas superficiales procedentes del ACR Humedales de Ventanilla", tesis planteada por la interesada para la obtención del grado de Doctor en Ingeniería Química de la casa de estudios superiores antes mencionada, de acuerdo al plan de investigación presentado.
2. La autorización emitida tiene una duración desde enero de 2020 hasta diciembre de 2022 y las actividades a desarrollar dentro del área natural protegida deben ejecutarse con el acompañamiento y supervisión del personal del Gobierno Regional del Callao.
3. El Gobierno Regional del Callao, en su calidad de administrador del Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla, se reserva el derecho de revocar la presente autorización, en caso de incumplir las condiciones establecidas en el numeral 1 de esta sección y/o de reportarse alguna falta a los reglamentos internos del área natural protegida.

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines, recomendando comunicar oficialmente de la presente autorización a la interesada, salvo mejor parecer.

Atentamente,


 GOBIERNO REGIONAL DEL CALLAO
 LIC. RAUL ZARATE RENDON
 ESPECIALISTA AMBIENTAL
 OAPYMA - GRUPOMA

ANEXO 03: Informe de laboratorio



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL-DA CON REGISTRO N° LE - 047



INFORME DE ENSAYO N° 160033-2022 CON VALOR OFICIAL

RAZÓN SOCIAL : FAJARDO VIDAL BARRA STELLA
 DOMICILIO LEGAL : ASOCIACIÓN ROSARIO DEL NORTE MZ. H LITE 23 - SAN MARTÍN DE PORRES - LIMA - LIMA
 SOLICITADO POR : FAJARDO VIDAL BARRA STELLA
 REFERENCIA : TESIS DOCTORAL
 PROCEDENCIA : ACR HUMEDALES DE VENTANILLA
 FECHA(S) DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS : 2022-01-04
 FECHA(S) DE ANÁLISIS : 2022-01-04 AL 2022-01-06
 FECHA(S) DE MUESTREO : 2022-01-04
 MUESTREADO POR : EL CLIENTE
 CONDICIÓN DE LA MUESTRA : LOS RESULTADOS DE ANÁLISIS SE APLICAN A LA MUESTRA(S) TAL COMO SE RECIBIÓ.

I. METODOLOGÍA DE ENSAYO:

Ensayo	Método	L.C.	Unidades
METALES TOTALES por ICP-MS: Plata, Aluminio, Arsénico, Bario, Boro, Cadmio, Cobalto, Cromo, Cobre, Mercurio, Manganeso, Molibdeno, Níquel, Plomo, Selenio, Silicio, Sodio, Torio, Uranio, Vanadio, Zinc.	EPA Method 200.8 Revisión 5.4 (1994). Determination of trace elements in waters and wastes by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry.	---	mg/L
METALES TOTALES por ICP-MS: Litio, Bismuto, Boro, Sodio, Magnesio, Silicio, Selenio, Silicato, Fósforo, Potasio, Calcio, Titanio, Hierro, Galio, Germanio, Rubidio, Estroncio, Zirconio, Niobio, Indio, Estaño, Cesio, Lantano, Cerio, Terbio, Lutecio, Tántalo, Wolframio	EPA Method 200.8, Revisión 5.4, 1994. Validado (Aplicado fuera del alcance), 2019. Determination of trace elements in waters and wastes by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry.	---	mg/L

L.C.: límite de clasificación.

II. RESULTADOS:

****Resultados de campo proporcionados por el cliente**

Parámetro	Unidades	31	32	33
		22010064	22010065	22010066
**pH	unidades pH	8.87	9.83	9.52
**Temperatura	°C	22.0	33.1	33.3
**Oxígeno Disuelto	mg/L	4.78	15.76	12.73
**Conductividad	mS/cm	37.6	86.5	21.9
**Salinidad	‰	23.8	>42	12.82
Parámetro	Unidades	34	35	36
		22010067	22010068	22010069
**pH	unidades pH	9.09	8.72	8.64
**Temperatura	°C	28.1	27.6	28.2
**Oxígeno Disuelto	mg/L	10.3	7.31	9.08
**Conductividad	mS/cm	14.8	15.4	18.49
**Salinidad	‰	8.59	8.8	10.94

** Resultados proporcionados por el cliente, no forman parte del alcance de la acreditación INACAL-DA.

Ing. Marilú Tello Paucar
 Director Técnico
 C.I.P. N° 219624
 Servicios Analíticos Generales S.A.C.

EXPERTS
 WORKING
 FOR YOU

C:\GAE\11\0033\160033-2022\160033-2022

DECLARACIONES: • Esta prueba le garantiza la calidad y fidelidad del presente documento e informe que se le ha emitido por el laboratorio de Servicios Analíticos Generales S.A.C. • Los resultados emitidos en este documento sólo son válidos para las muestras analizadas en el presente informe. • Los resultados serán proporcionados al cliente al período de validez del presente informe. • Los resultados serán válidos por un máximo de 30 días de haber ingresado las muestras al laboratorio y luego serán revalidados. • Para conocer la AUTENTICIDAD del presente informe contactarse al correo laboratorio@sagperu.com. • Cualquier modificación es susceptible, siendo el laboratorio el responsable de la actualización de este documento en papel y sus copias digitales por procesos de actualización.

SERVICIOS ANALÍTICOS GENERALES S.A.C.

Laboratorio Av. Naciones Unidas N° 1565 Urb. Chacra Río Norte - Lima • Oficinas Administrativas Pisco Ciudadito Matto de Turner N° 2079 - Lima
 • Central Telefónica: (511) 425-0885 • Web: www.sagperu.com • Contacto Electrónico: sagperu@sagperu.com



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL-DA CON REGISTRO N° LE - 047



INFORME DE ENSAYO N° 160033-2022 CON VALOR OFICIAL

II. RESULTADOS:

Producto declarado		Agua Subterránea	Agua Superficial	Agua Superficial	
Matriz analizada		Agua Natural	Agua Natural	Agua Natural	
Fecha de muestreo		2022-01-04	2022-01-04	2022-01-04	
Hora de inicio de muestreo (h)		15:18	13:00	14:10	
Condiciones de la muestra		Refrigerada/ Preservada	Refrigerada/ Preservada	Refrigerada/ Preservada	
Código del Cliente		31	32	33	
Código del Laboratorio		22010064	22010065	22010066	
Especie	L.D.M.	Unidades	Resultados		
Metales totales					
Litio (Li)	0.00006	mg/L	0.09567	0.09265	0.04768
Berilio (Be)	0.00001	mg/L	0.00002	<0.00001	<0.00001
Boro (B)	0.0002	mg/L	3.9383	4.1452	2.8732
Sodio (Na)	0.003	mg/L	5780.000	16245.694	3798.766
Magnesio (Mg)	0.004	mg/L	>400	>400	268.268
Aluminio (Al)	0.004	mg/L	0.999	0.060	0.116
Silicio (Si)	0.004	mg/L	11.325	2.549	13.095
Silice (SiO ₂)	0.006	mg/L	24.235	5.456	28.023
Silicato (SiO ₂)	0.01	mg/L	30.69	6.91	35.49
Fosforo (P)	0.002	mg/L	0.183	0.149	0.387
Potasio (K)	0.007	mg/L	320.613	>400	175.251
Calcio (Ca)	0.004	mg/L	756.930	822.915	1075.168
Titonio (Ti)	0.00005	mg/L	0.04721	0.00202	0.00475
Vanadio (V)	0.00004	mg/L	0.01444	0.00507	0.00299
Cromo (Cr)	0.0002	mg/L	0.0025	0.006	0.0097
Manganeso (Mn)	0.00001	mg/L	0.61225	0.25168	0.19184
Hierro (Fe)	0.00005	mg/L	2.42203	0.41225	0.31027
Cobalto (Co)	0.000005	mg/L	0.002138	0.000293	0.00035
Níquel (Ni)	0.00002	mg/L	0.00376	0.00107	0.00084
Cobre (Cu)	0.0001	mg/L	0.0261	0.0041	0.0053
Zinc (Zn)	0.00005	mg/L	0.09419	0.01841	0.01778
Galio (Ga)	0.00002	mg/L	0.00039	<0.00002	0.00005
Arsénico (As)	0.00001	mg/L	0.00015	0.00010	0.00007
Selenio (Se)	0.00001	mg/L	0.01856	0.00658	0.01322
Rubidio (Rb)	0.00002	mg/L	0.0005	0.0007	0.0007
Estroncio (Sr)	0.00002	mg/L	0.08363	0.19036	0.04918
Zirconio (Zr)	0.00002	mg/L	8.72928	13.11122	7.99208
Niobio (Nb)	0.00001	mg/L	0.00046	0.00043	0.00044
Hafnio (Hf)	0.00001	mg/L	0.00051	0.00046	0.00105
Tantalo (Ta)	0.00005	mg/L	0.04612	0.14467	0.00332
Plata (Ag)	0.00002	mg/L	<0.00002	<0.00002	<0.00002
Cadmio (Cd)	0.00002	mg/L	0.00103	0.00021	0.00019
Indio (In)	0.00002	mg/L	0.00006	<0.00002	<0.00002
Estaño (Sn)	0.0004	mg/L	0.0013	<0.0004	<0.0004
Antimonio (Sb)	0.0001	mg/L	0.0064	0.0052	0.0030
Cesio (Cs)	0.00002	mg/L	0.00101	0.00155	0.00043
Bario (Ba)	0.00002	mg/L	0.04252	0.04875	0.04656
Lantano (La)	0.000002	mg/L	0.003980	0.000339	0.001233
Cerio (Ce)	0.000004	mg/L	0.002426	0.000089	0.000364
Terbio (Tb)	0.00001	mg/L	0.00003	<0.00001	<0.00001
Lutecio (Lu)	0.000001	mg/L	0.000014	0.000002	<0.000001
Tantalio (Ta)	0.00001	mg/L	0.00011	0.00008	0.00005
Wolframio (W) Tungsteno	0.00002	mg/L	0.00048	0.00055	0.00058
Mercurio (Hg)	0.00002	mg/L	<0.00002	<0.00002	<0.00002
Talio (Tl)	0.00002	mg/L	0.00030	<0.00002	<0.00002
Plomo (Pb)	0.0001	mg/L	0.0257	0.0065	0.0040
Bismuto (Bi)	0.00004	mg/L	0.000374	0.000012	<0.000004
Torio (Th)	0.000005	mg/L	0.001326	0.000499	0.000304
Uranio (U)	0.000002	mg/L	0.004823	0.003455	0.000204

L.D.M.: límite de detección del método.

EXPERTS WORKING FOR YOU

OBSERVACIONES: • Está prohibida la reproducción parcial o total de este documento a menos que sea bajo la autorización escrita de Servicios Analíticos Generales S.A.C. • Los resultados reflejados en este documento solo son válidos para las muestras reflejadas en el presente informe. • Las muestras serán conservadas de acuerdo al período de sensibilidad del procedimiento analítico con un máximo de 30 días de haber ingresado las muestras al laboratorio. Luego serán eliminadas. • Para corroborar la AUTENTICIDAD del presente informe comuníquese al correo laboratorio@sagpera.com. • Cualquier modificación no autorizada, invalida o falsifica el contenido e de la vigencia de este documento en legal y las responsabilidades serán asumidas de acuerdo a lo.

SERVICIOS ANALÍTICOS GENERALES S.A.C.

Laboratorio Av. Naciones Unidas N° 1565 Urb. Chacra Pico Norte - Lima • Oficinas Administrativas Pisco Clorinda Matto de Turner N° 2079 - Lima • Central Telefónica (511) 425-8895 • Web: www.sagpera.com • Contacto Electrónico sagpera@sagpera.com



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL-DA CON REGISTRO N° LE - 047



INFORME DE ENSAYO N° 160033-2022 CON VALOR OFICIAL

II. RESULTADOS:

Producto declarado	Agua Superficial	Agua Superficial	Agua Superficial
Matriz analizada	Agua Natural	Agua Natural	Agua Natural
Fecha de muestreo	2022-01-04	2022-01-04	2022-01-04
Hora de inicio de muestreo (h)	11:21	11:38	11:57
Condiciones de la muestra	Refrigerada/Preservada	Refrigerada/Preservada	Refrigerada/Preservada
Código del Cliente	J4	J5	J6
Código del Laboratorio	22010067	22010068	22010069
Ensayo	L.D.M.	Unidades	Resultados
Metasles totales			
Litio (Li)	0.00006	mg/L	0.05362
Berilio (Be)	0.00001	mg/L	<0.00001
Boro (B)	0.0002	mg/L	1.5899
Sodio (Na)	0.003	mg/L	2310.350
Magnesio (Mg)	0.004	mg/L	194.531
Aluminio (Al)	0.004	mg/L	0.026
Silicio (Si)	0.004	mg/L	0.414
Silice (SiO ₂)	0.008	mg/L	0.285
Silicato (SiO ₂)	0.01	mg/L	1.12
Fosforo (P)	0.002	mg/L	0.014
Potasio (K)	0.007	mg/L	137.044
Calcio (Ca)	0.004	mg/L	819.497
Titanio (Ti)	0.00005	mg/L	0.00109
Vanadio (V)	0.00004	mg/L	0.00067
Cromo (Cr)	0.0002	mg/L	0.0007
Manganeso (Mn)	0.00001	mg/L	0.034448
Hierro (Fe)	0.00005	mg/L	0.07592
Cobalto (Co)	0.000006	mg/L	0.000178
Niquel (Ni)	0.00002	mg/L	0.00175
Cobre (Cu)	0.0003	mg/L	0.0040
Zinc (Zn)	0.00005	mg/L	0.01341
Gaio (Ga)	0.00002	mg/L	0.00002
Germanio (Ge)	0.00002	mg/L	<0.00002
Arsenico (As)	0.00001	mg/L	0.00164
Selenio (Se)	0.0002	mg/L	0.0585
Rubidio (Rb)	0.00002	mg/L	0.04166
Estroncio (Sr)	0.00001	mg/L	5.50758
Zirconio (Zr)	0.00002	mg/L	0.00016
Niobio (Nb)	0.00001	mg/L	0.00118
Molibdeno (Mo)	0.00005	mg/L	0.01658
Plata (Ag)	0.00002	mg/L	<0.00002
Cadmio (Cd)	0.00002	mg/L	0.00015
Indio (In)	0.00002	mg/L	<0.00002
Estaño (Sn)	0.0004	mg/L	<0.0004
Antimonio (Sb)	0.0001	mg/L	0.0005
Cesio (Cs)	0.00002	mg/L	0.00044
Bario (Ba)	0.00002	mg/L	0.0381
Lantano (La)	0.00002	mg/L	0.000107
Cerio (Ce)	0.00004	mg/L	0.000065
Terbio (Tb)	0.00001	mg/L	<0.00001
Lutacio (Lu)	0.00001	mg/L	<0.00001
Tantalo (Ta)	0.00001	mg/L	0.00007
Wolframio (W) / Tungsteno	0.00002	mg/L	0.0001
Mercurio (Hg)	0.00002	mg/L	<0.00002
Talio (Tl)	0.00002	mg/L	0.00002
Plomo (Pb)	0.0001	mg/L	0.0123
Bismuto (Bi)	0.00004	mg/L	<0.00004
Torio (Th)	0.00005	mg/L	0.000275
Uranio (U)	0.00002	mg/L	0.002324

L.D.M.: Límite de detección del método.

EXPERTS WORKING FOR YOU

Lima, 12 de Enero del 2022.

Observaciones: • Esta prohibida la reproducción parcial o total del presente documento a menos que sea bajo la autorización escrita de Servicios Analíticos Generales S.A.C. • Los resultados emitidos en este documento sólo son válidos para las muestras referidas en el presente informe. • Las muestras serán conservadas de acuerdo al periodo de preservación del parámetro analizado con un máximo de 30 días de haber ingresado las muestras al laboratorio. Luego serán eliminadas. • Para confirmar la AUTENTICIDAD del presente informe comuníquese al correo laborsag@agperu.com. • Cualquier modificación no autorizada, fraude o falsificación del contenido o de la posterioridad de este documento es ilegal y sus causantes serán perseguidos de acuerdo a ley.

SERVICIOS ANALÍTICOS GENERALES S.A.C.

Laboratorio Av. Naciones Unidas N° 1565 Urb. Chacra Riso Racho - Lima • Oficinas Administrativas Pisco: Clorinda Matto en Turner N° 2879 - Lima • Central Telefónica (511) 425-4885 • Web: www.sagperu.com • Contacto Electrónico sagperu@sagperu.com

ANEXO 04: Reactivación de levadura comercial

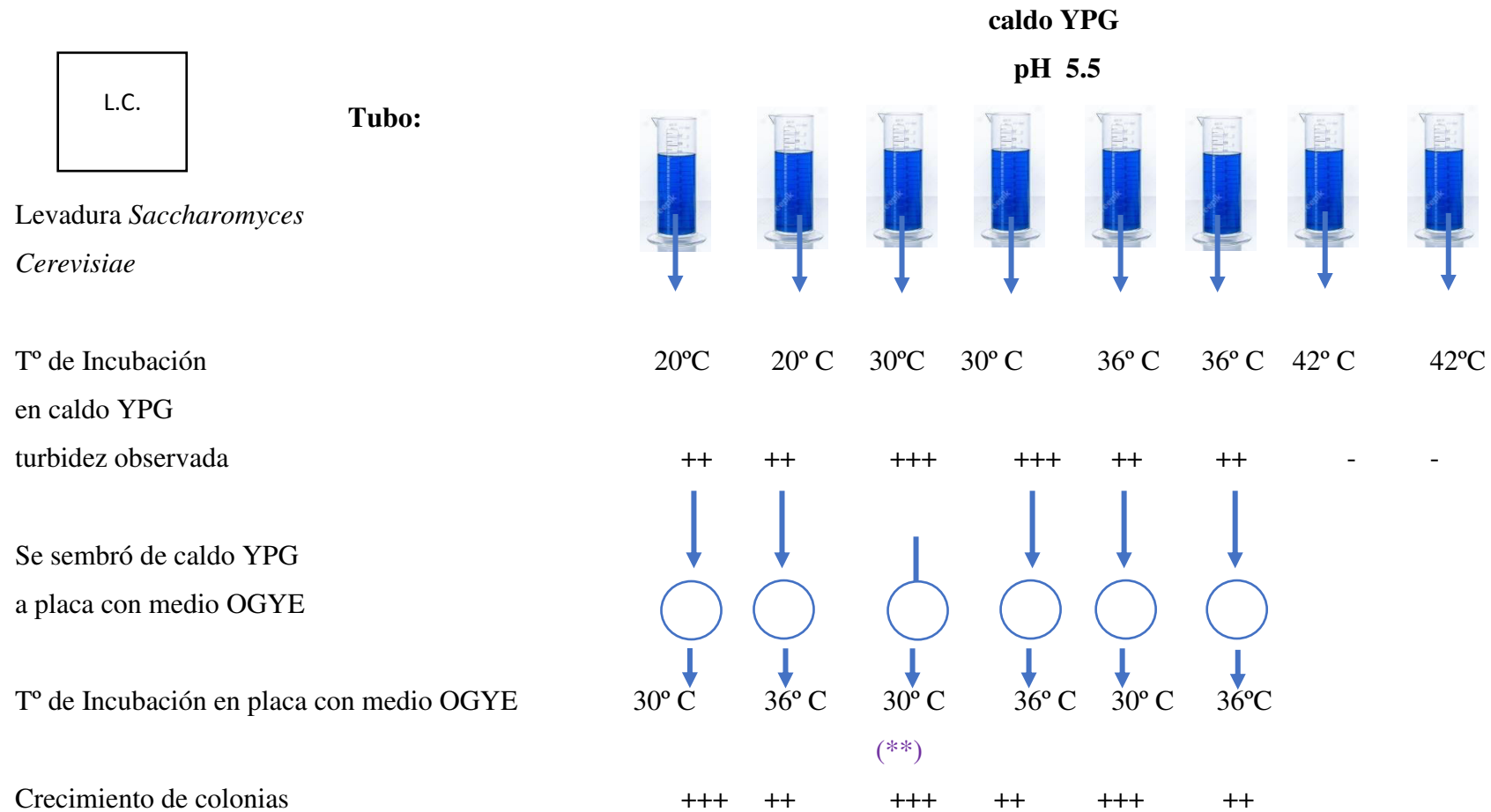


Figura A.4: Esquema de reactivación de cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae*

ANEXO 05: Cepario medio YPG pH 5.5

Tubo YPG
pH 5.5

Tubo de 15 x 100 mm en plano inclinado

Se pasaron a cepario las cepas de levaduras codificadas con crecimiento positivo en caldo YPG pH 5.5 con antibiótico y que presentaron morfología de levadura en coloración gram y azul de metileno observadas al microscopio.

Figura A.5: Cepario de levaduras codificadas

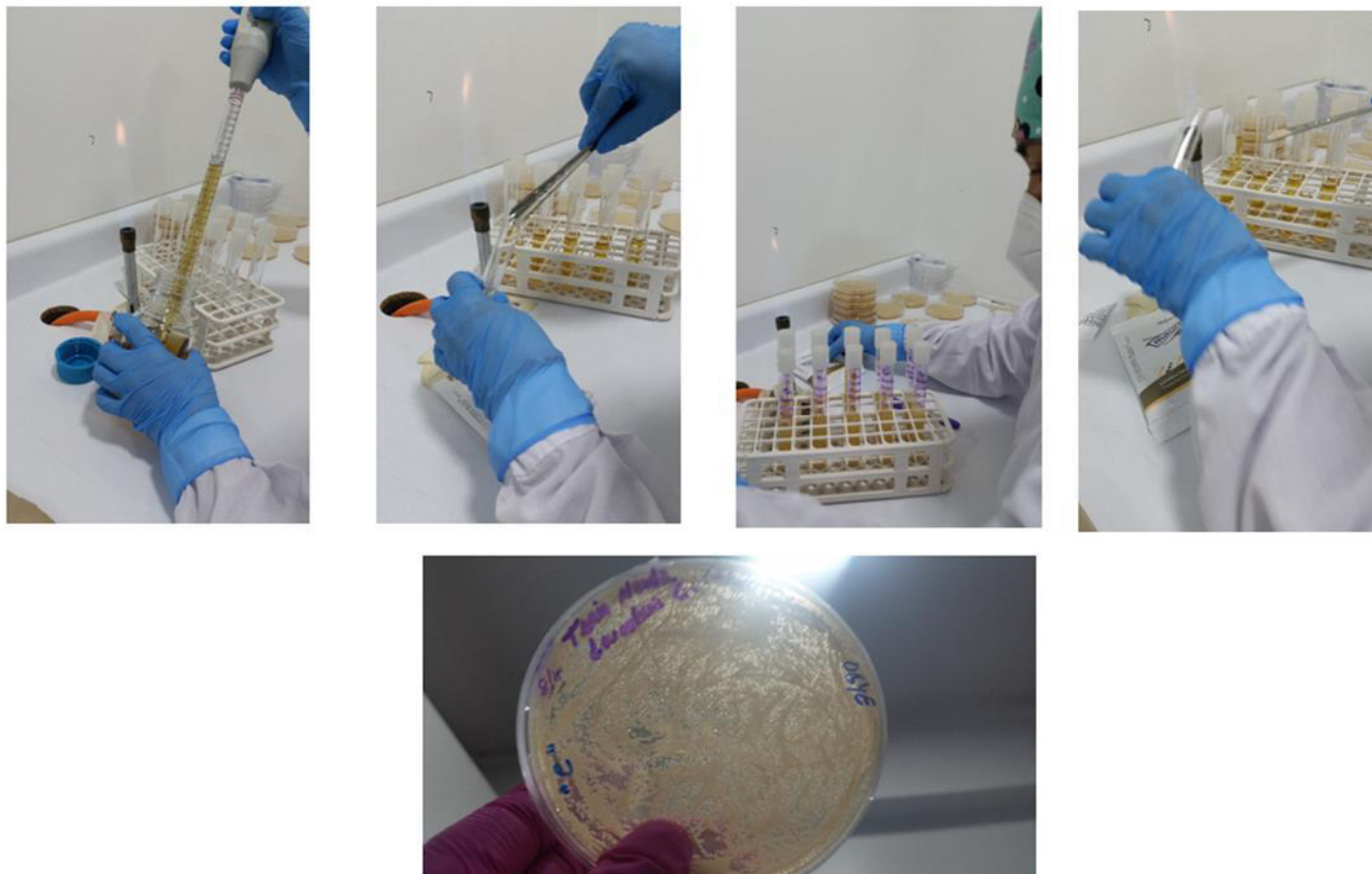
ANEXO 06: Aislamiento de microorganismos del ACR Humedales de Ventanilla

Figura A.6: Aislamiento de microorganismos en el screening primario

ANEXO 07: Aislamiento de microorganismos sospechosos de ser levaduras a cepario en tubos con medio YPG



Figura A.7.1: Medios de cultivo para el mantenimiento de cepas de levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla



Figura A.7.2: Siembra de las cepas de levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla en medio YPG

ANEXO 08: Microscopia de las levaduras aisladas del ACR Humedales de Ventanilla

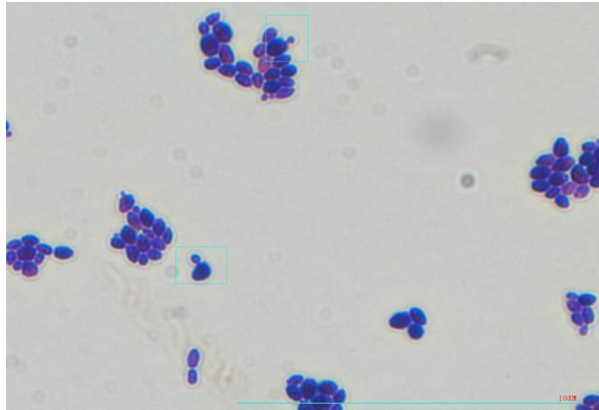


Figura A.8.1: Candida guilliermondii

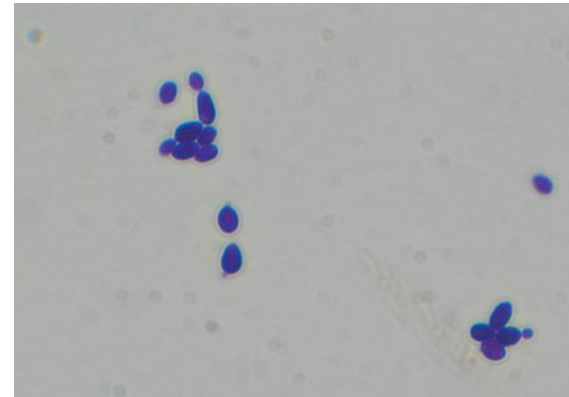


Figura A.8.2: Rhodotorula mucilaginosa

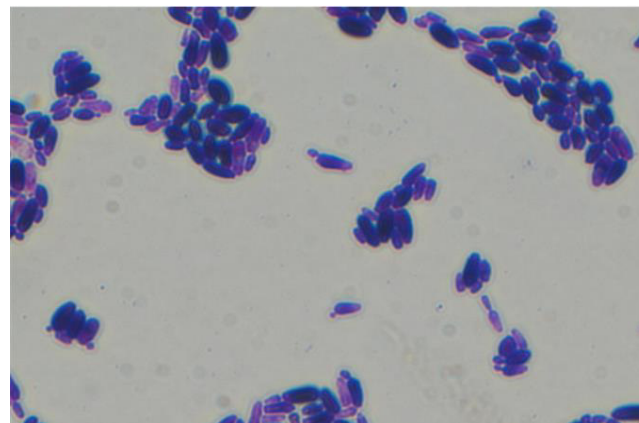


Figura A.8.3: Cryptococcus humicola

ANEXO 9: *Candida guilliermondii* en cámara Neubauer

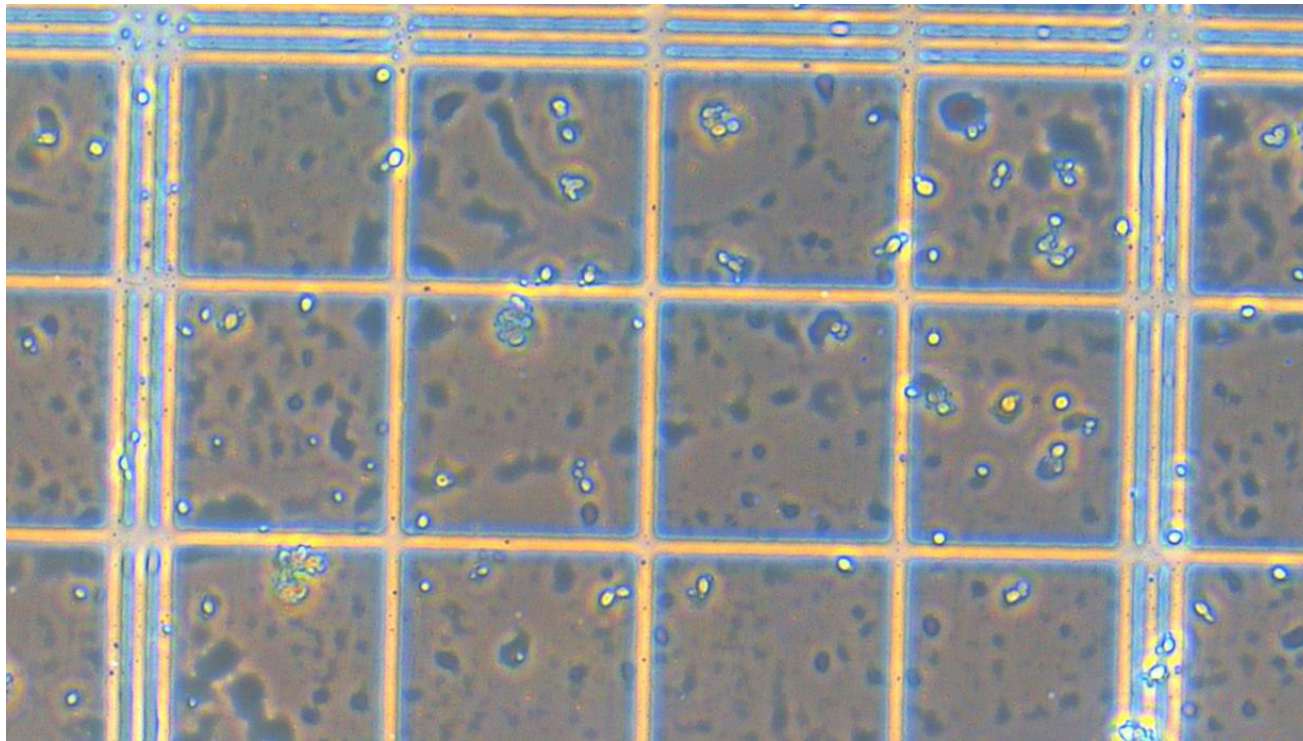


Figura A.9: Cepa J1-JJJ Candida guilliermondii como levadura activa

ANEXO 10: Observación al microscopio de las levaduras aisladas

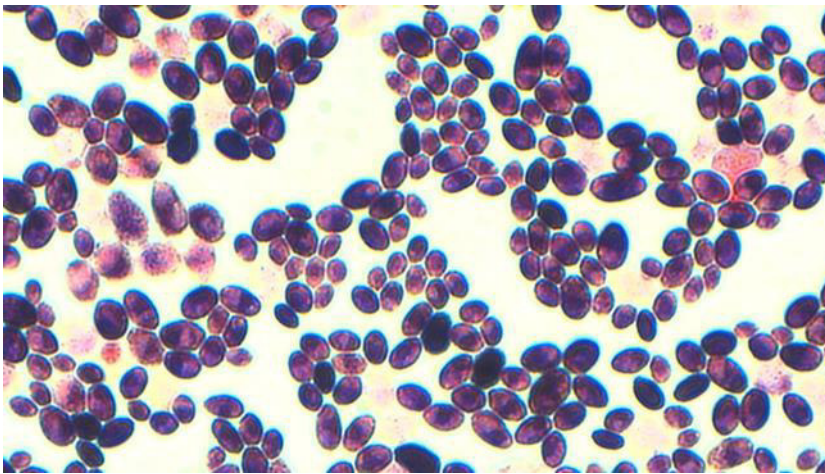


Figura A.10.1: Cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae*

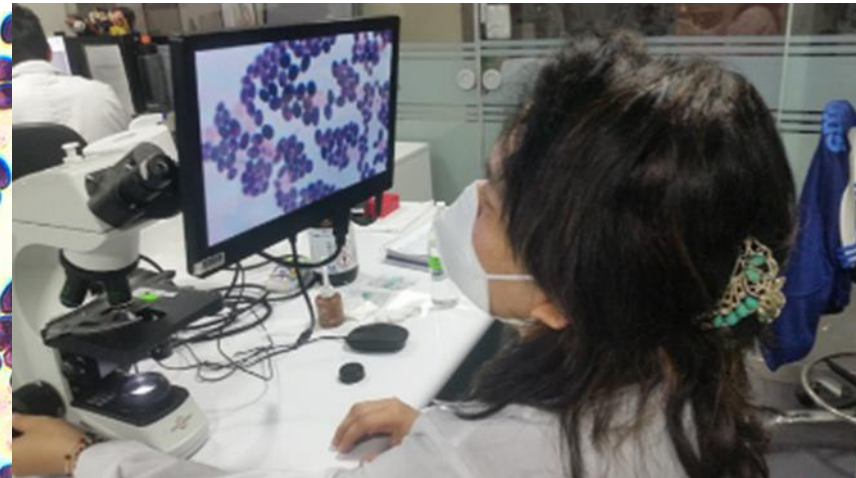


Figura A.10.2: Observación al microscopio de levadura comercial

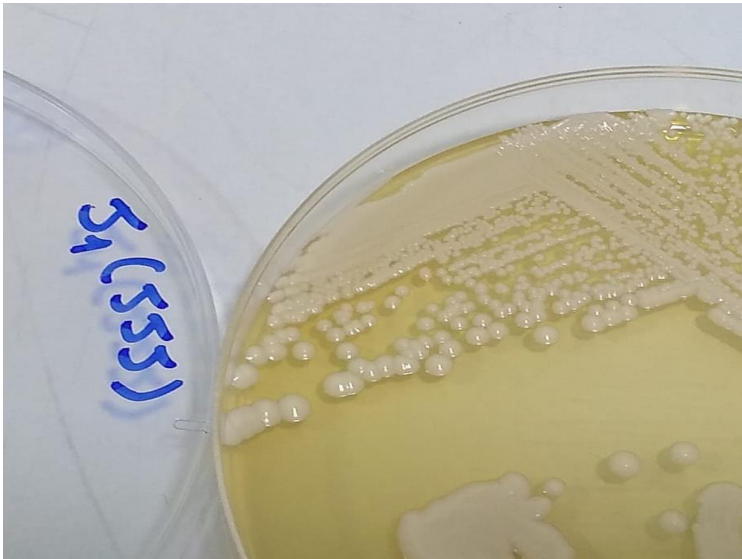
ANEXO 11: Identificación de levaduras con el kit API 32 C a partir de cultivos puros

Figura A.11.1: Levadura Candida guilliermondii



Figura A.11.2: Lectura de la prueba API 32C

ANEXO 12: Procesamiento de la matriz de diseño experimental



Figura A.12.1: Toma de muestras de la matriz de diseño experimental



Figura A.12.2: Las muestras se colectaron en tubos falcon estériles

ANEXO 13: Procesamiento de matriz experimental 3

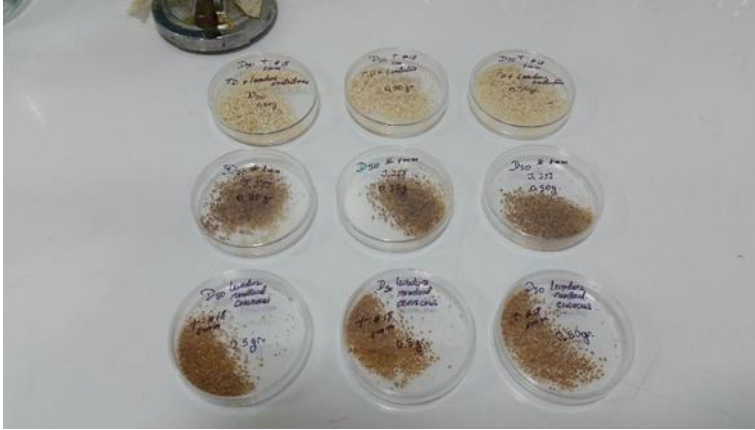


Figura A.13.1: Matrices estructurales de levaduras inactivadas

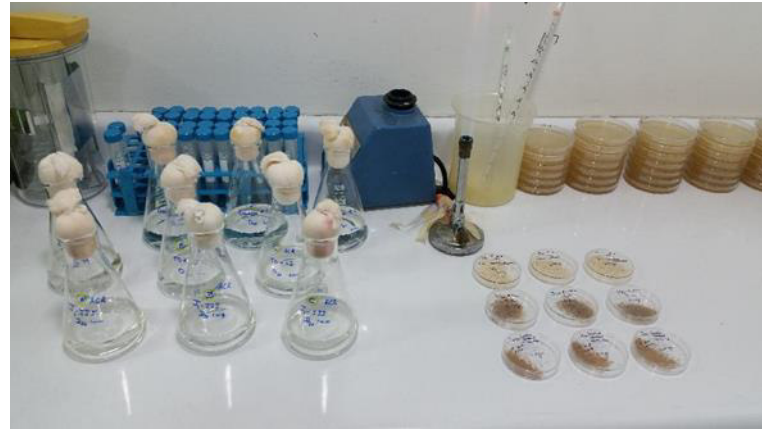


Figura A.13.2: Matraces con agua del ACR Humedales de Ventanilla

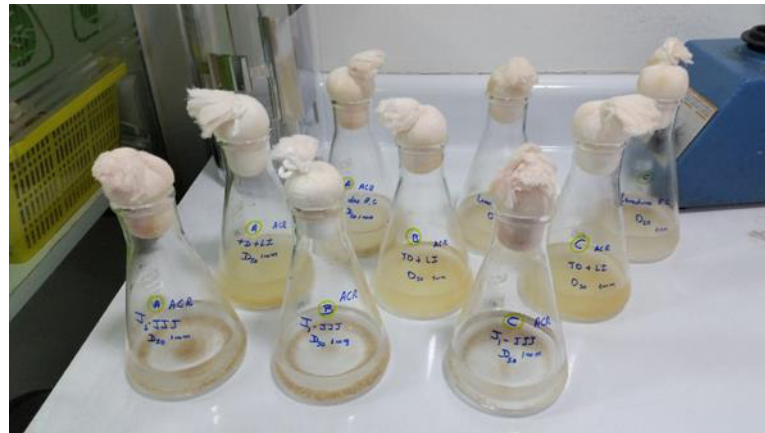


Figura A.13.3: Sistema de matriz experimental 3 después de 1h a 30°C a 150 rpm

ANEXO 14: Equipo de optimización empleado en la tesis doctoral

Figura A.14.1: Cabina de flujo laminar



Figura A.14.2: Shaker incubador (equipo de optimización)

ANEXO 15: Certificado de análisis del Kit API 32C

BIOMÉRIEUX			Page 1 of 2
REF 32200		LOT 1009079520	
Certificate of Analysis Certificat d'Analyse			
REF 32200	ID 32C		
LOT 1009079520	ID 32C		
2021-11-18	YYYY-MM-DD		Revision : 12
2022-11-16	YYYY-MM-DD		
REF	Component / Composant	Kit component / Composant du kit	LOT
	80003156	C Medium ampoules / Ampoules C Medium	1008824380
	8307535	ID 32C strips / Galeries ID 32C	1009079500
Test(s) / Contrôle(s)	Result(s) / Résultat(s)	Specification(s) / Spécification(s)	
Contrôle des galeries Strips control			
Identité des plaques Plates identity	Conform / Conforme	Plaques ID 32C ID 32C plates	
Tests bactériologiques : Bacteriological tests : Candida glabrata ATCC 64677 Cryptococcus humicola ATCC 64678	Conform / Conforme	Voir notice technique : See package insert : ID 32C	
Recherche de contaminants Detection of contaminants	Conform / Conforme	Conformité / Spécifications Conformity / Specifications	
Contrôle du C Medium C Medium control			
Aspect Medium appearance	Conform / Conforme	Liquide limpide, légèrement visqueux Clear liquid, slightly viscous	
Volume Filling volume	Conform / Conforme	7.0 - 7.8 mL	
pH pH value	Conform / Conforme	6.4 - 6.8	
Tests bactériologiques : Bacteriological tests : Candida guilliermondii ATCC 6260 Cryptococcus laurentii ATCC 18803 Candida glabrata ATCC 15126	Conform / Conforme	Voir notice technique : See package insert : API 20C AUX	
Contrôle du conditionnement Conformity after packaging			
Contrôle du conditionnement Conformity after packaging	Conform / Conforme	Conformité / Spécifications Conformity / Specifications	
bioMérieux SA 376 Chemin de l'Orme 69280 MARCY-LETOILE - FRANCE Manufacturing site : bioMérieux - LA BALME - FRANCE			

BIOMÉRIEUX

Page 2 of 2

REF 32200**LOT** 1009079520

Certificat de contrôle établi selon les techniques de contrôle :
Control certificate according to the control procedures :
010947 (galeries ID 32C / ID 32C strips)
041983 (C medium)

Composition du coffret : boîtes de 25 galeries + 25 ampoules C Medium
Kit composition : kit of 25 strips + 25 ampoules C medium

Lot accepted on / Lot accepté 13-JAN-2022

by / par: TALLARON Géraldine
Quality Department / Département Qualité
bioMérieux - LA BALME - FRANCE

This document has been released electronically / Ce document a été libéré électroniquement