

6. RESULTADOS.

6.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DE CADMIO. (C.M.I.).

En la siguiente tabla se pueden observar las absorbancias de los cultivos de *K. pneumoniae* y *B. subtilis* adicionados de diferentes concentraciones de cadmio. En este primer experimento se puede notar un crecimiento similar en las dos cepas usadas y en las cinco concentraciones probadas.

Concentración Cadmio (ppm)	Absorbancia (620nm)	
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>
1	0.504	0.531
2	0.475	0.271
3	0.533	0.327
4	0.475	0.550
5	0.401	0.561

Tabla 6.1. Absorbancias para *K. pneumoniae* y *B. subtilis* cultivadas en medio V-B con glucosa, adicionado con diferentes concentraciones de cadmio después de un período de incubación de 5 días.

En un segundo experimento se adicionó tiosulfato de sodio para poder establecer si la tolerancia de las bacterias al cadmio se debía a un proceso de precipitación como sulfuro de cadmio, y los resultados se indican en la tabla 6.2.

Concentración Cadmio (ppm)	Absorbancia (620nm) Sin tiosulfato		Absorbancia (620nm) Con tiosulfato	
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>
10	0.339	0.187	0.298	0.362
15	0.267	0.157	0.328	0.257
20	0.283	0.151	0.257	0.172
25	--	--	--	--

Tabla 6.2. Absorbancias para *K. pneumoniae* y *B. subtilis* en presencia y ausencia de tiosulfato de sodio.

Se puede observar que el *B. subtilis* es más sensible al cadmio que *K. pneumoniae* cuando no se adiciona tiosulfato, sin embargo cuando el medio contiene tiosulfato el comportamiento es muy similar en las dos bacterias. La concentración mínima inhibitoria para ambas cepas se estableció en 25 ppm de cadmio.

Además de este análisis, las muestras fueron procesadas para la medición del cadmio utilizando el Espectrofotómetro de Absorción atómica de flama, obteniéndose los resultados siguientes:

<i>K. pneumoniae</i>			<i>B. subtilis</i>		
[cadmio] inicial (ppm)	[cadmio] final (ppm)	% inmovilización	[cadmio] inicial (ppm)	[cadmio] final (ppm)	% inmovilización
1	0.0485	95.15	1	0.0084	99.16
2	0.0981	95.10	2	0.0931	95.35
3	0.2549	91.35	3	0.2049	93.17
4	0.3861	90.35	4	0.3663	90.84
5	1.1467	77.07	5	1.0199	79.60

Tabla 6.3. Concentraciones iniciales y finales de cadmio medidas en el sobrenadante de los cultivos en ambas cepas después de un período de incubación de 5 días.

En la tabla 6.3 se observa que para ambas cepas el porcentaje de inmovilización del cadmio es muy similar. Conforme aumenta la concentración de cadmio en el medio, el porcentaje de inmovilización va disminuyendo, de este modo entre menor es la concentración de cadmio, la capacidad de inmovilización de las cepas es mayor.

Por otro lado los porcentajes de inmovilización de ambas cepas para las concentraciones de 10, 15 y 20 ppm, con y sin tiosulfato, se presentan en las tablas 6.4 y 6.5.

<i>K. pneumoniae</i>				
[cadmio] inicial (ppm)	Cadmio final (ppm) Sin tiosulfato	% inmovilización	Cadmio final (ppm) Con tiosulfato	% inmovilización
10	2.248	77.52	0.832	91.68
15	3.274	78.17	0.807	94.62
20	3.96	80.20	2.935	85.33

Tabla 6.4. Concentraciones iniciales y finales de cadmio para *K. pneumoniae* medidas en el sobrenadante de los cultivos después de un periodo de incubación de 5 días.

Para *Bacillus subtilis* se observó lo siguiente:

<i>B. subtilis</i>				
[cadmio] inicial (ppm)	Cadmio final (ppm) Sin tiosulfato	% inmovilización	Cadmio final (ppm) Con tiosulfato	% inmovilización
10	2.487	75.13	1.088	89.12
15	3.195	78.70	2.505	83.30
20	3.956	80.22	3.608	81.96

Tabla 6.5. Concentraciones iniciales y finales de cadmio para *B. subtilis* medidas en el sobrenadante de los cultivos después de un periodo de incubación de 5 días.

Como puede apreciarse en las tablas 6.4 y 6.5, ambas cepas se comportan de manera muy similar, debido a que la reducción del cadmio soluble es mayor cuando el tiosulfato de sodio se adiciona al medio, sobre todo a concentraciones de 10 y 15 ppm.

6. 2 DETERMINACION DE CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

Tomando en cuenta los resultados anteriores se decidió trabajar con 2 ppm de cadmio ya que son las máximas concentraciones que se han encontrado en los suelos que se quieren biorremediar, además de que a ésta concentración el crecimiento de las bacterias fue más rápido.

En las tablas 6.6 y 6.7 se muestran las lecturas de absorbancia de los cultivos de *B. subtilis* y *K. pneumoniae* en ausencia y presencia de cadmio.

Absorbancia (620nm) sin cadmio			
Tiempo (hrs)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>	ambas cepas
0	0.034	0.066	0.088
3.5	0.037	0.067	0.093
6.0	0.063	0.069	0.131
22.0	0.094	0.094	0.150
25.5	0.096	0.096	0.152
45.5	0.108	0.090	0.180
48.5	0.108	0.088	0.156
53.0	0.110	0.086	0.156
72.0	0.116	0.086	0.166
77.0	0.114	0.084	0.165

Tabla 6.6. Absorbancia medida para *K. pneumoniae*, *B. subtilis* y ambas cepas a tiempos determinados, en ausencia de Cadmio.

Absorbancia (620nm) con cadmio			
Tiempo (hrs)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>	ambas cepas
0	0.031	0.037	0.085
3.5	0.031	0.038	0.091
6.0	0.036	0.030	0.116
22.0	0.090	0.020	0.148
25.5	0.093	0.025	0.149
45.5	0.099	0.022	0.152
48.5	0.098	0.027	0.153
53.0	0.097	0.018	0.153
72.0	0.106	0.022	0.159
77.0	0.104	0.020	0.155

Tabla 6.7. Absorbancia medida para *K. pneumoniae*, *B. subtilis* y ambas cepas a tiempos determinados, en presencia de Cadmio.

A partir de estos resultados, se presenta a continuación el gráfico donde se muestran las comparaciones entre las curvas de crecimiento bacteriano de *K. pneumoniae*, en presencia y ausencia de cadmio.

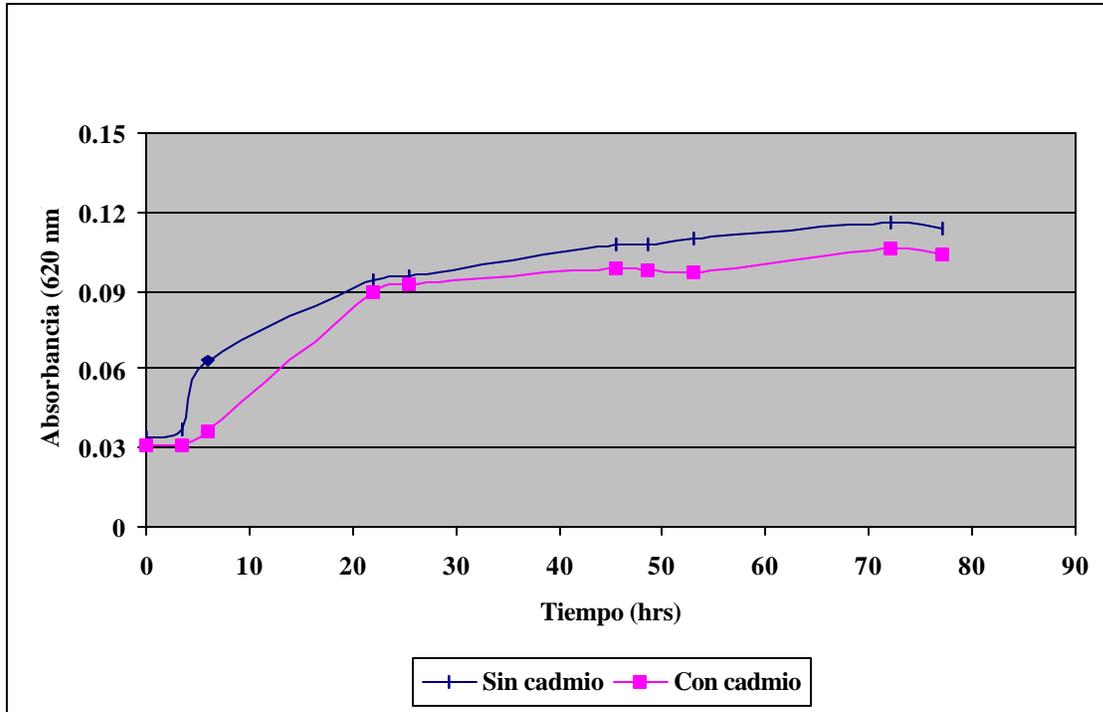


Gráfico 6.1. Curvas de crecimiento para la cepa *K. pneumoniae* en presencia y ausencia de Cadmio.

En la curva de crecimiento para *K. pneumoniae* en ausencia del metal, mostradas en el gráfico 6.1, se observa una curva clásica de crecimiento bacteriano, con una fase lag de 4 horas, seguida de una etapa exponencial a que dura aproximadamente 21 horas y una fase estacionaria que se mantiene hasta las 80 horas.

Por otra parte, en este mismo gráfico se presenta la curva de crecimiento de *K. pneumoniae* en presencia de Cadmio, en donde se aprecia una fase lag a partir de las 4 horas de crecimiento, seguida de una fase exponencial que dura cerca de 18 horas, desde las 4 hasta las 22 horas aproximadas de la inoculación, y posteriormente una fase estacionaria.

De este modo se aprecia claramente que la cepa *K. pneumoniae* presenta una curva de crecimiento muy similar tanto en presencia como en ausencia de cadmio, a partir de la inoculación, con una fase lag bien caracterizada; se alcanza el punto máximo de la fase exponencial en un mismo tiempo, a partir del cual se observa una clara fase estacionaria.

Al graficar los valores de las tablas 6.6 y 6.7 obtenidos para *B. subtilis* en ausencia y presencia de cadmio, puede observarse la comparación entre cada una de las curvas como se muestra a continuación:

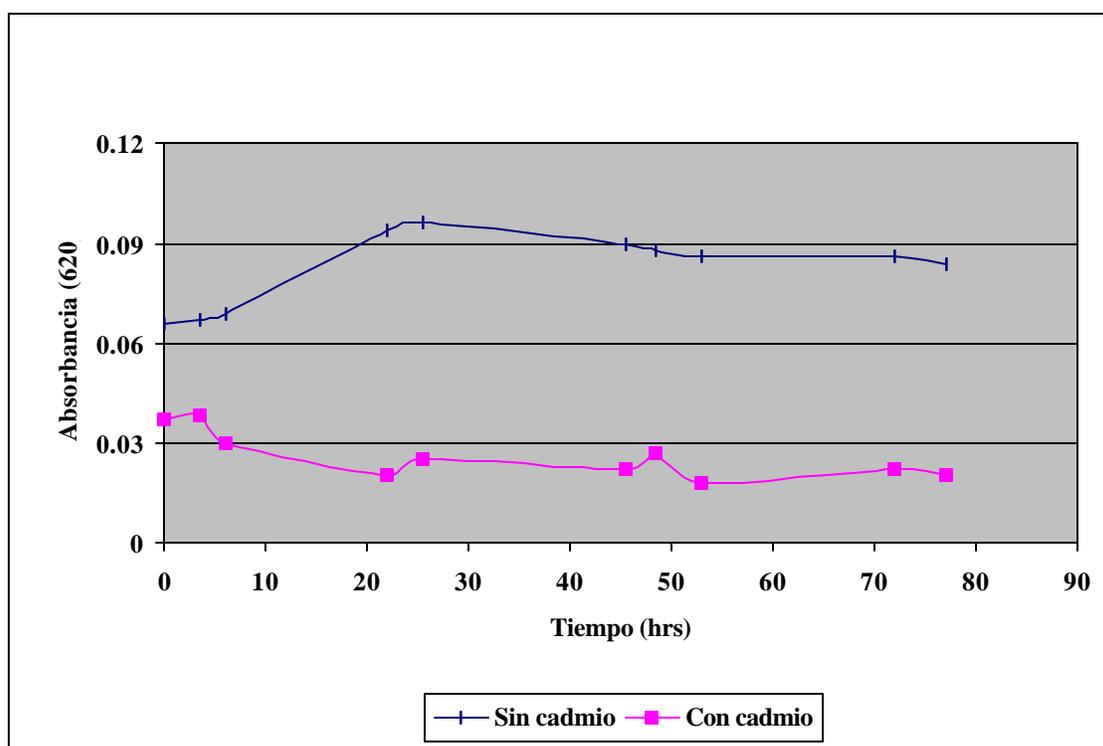


Gráfico 6.2. Curvas de crecimiento para la cepa *B. subtilis* en presencia y ausencia de Cadmio.

En la curva sin cadmio, se aprecia que la cepa presenta una fase lag de 6 horas, y llega a una fase exponencial hasta las 26 horas aproximadas de inoculación, posteriormente comienza una ligera reducción en el crecimiento bacteriano, denotada por un decremento en la absorbancia leída en el medio.

Así mismo se observa que *B. subtilis*, en presencia de cadmio, sufre una notable disminución en la absorbancia leída, por lo que dicha cepa no forma una curva de crecimiento típica, si no al contrario, desde el momento de la inoculación se observa un fase lag de aproximadamente 4 horas a partir del cual, se aprecian disminuciones severas en la curva de crecimiento con ligeras fluctuaciones.

Por lo tanto, como se ha mencionado, *B. subtilis* se ve claramente influenciada por el cadmio presente en el medio, debido a que en presencia de éste las células mueren inmediatamente después de las 4 horas.

Finalmente, para los matraces que contenían tanto *K. pneumoniae* como *B. subtilis*, el gráfico respectivo que muestra la comparación de las curvas de crecimiento bacteriano en ausencia y presencia de cadmio muestra lo siguiente:

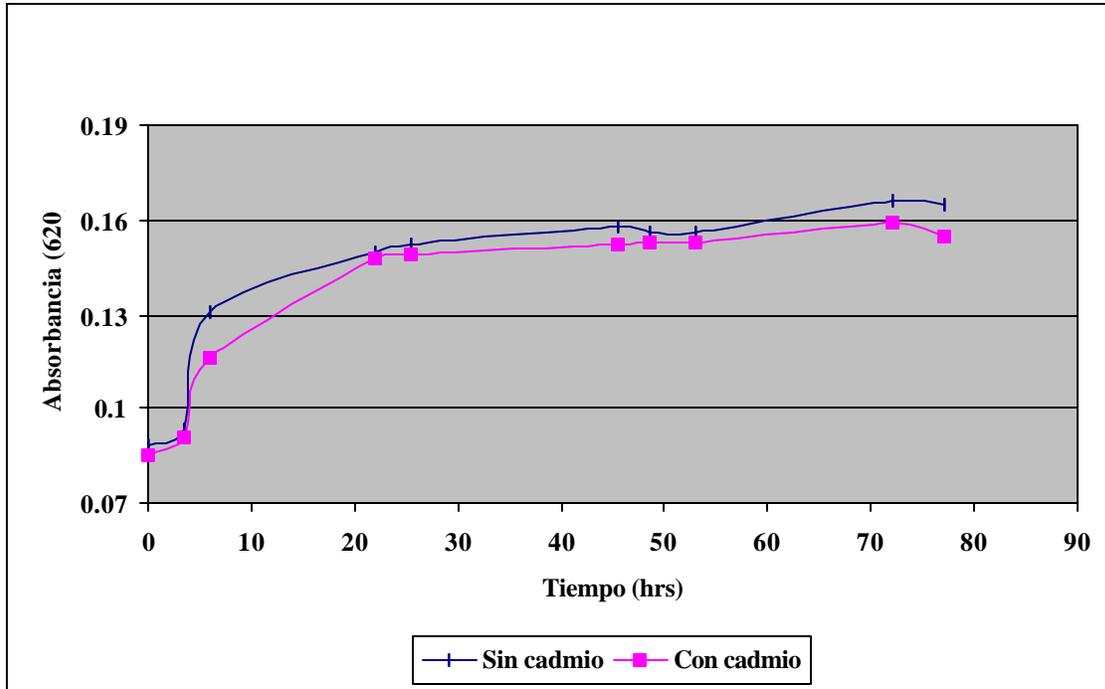


Gráfico 6.3. Curvas de crecimiento de un cultivo mixto de *K. pneumoniae* y *B. subtilis* en presencia y ausencia de Cadmio.

Se observa que la fase exponencial se alcanza a partir de las 3.5 horas aproximadas posterior a la fase lag, con una duración aproximada de 20.5 horas en donde se llega a una fase estacionaria.

Al estar el metal presente, se observó claramente una curva de crecimiento bacteriana típica, con una fase lag de 3.5 horas, alcanzando la fase exponencial después de este tiempo y manteniéndose hasta las 22 horas aproximadas desde la inoculación, logrando una posterior fase estacionaria.

En el gráfico 6.4 se comparan de las curvas de crecimiento de *K. pneumoniae*, *B. subtilis* y el cultivo mixto en un medio sin cadmio.

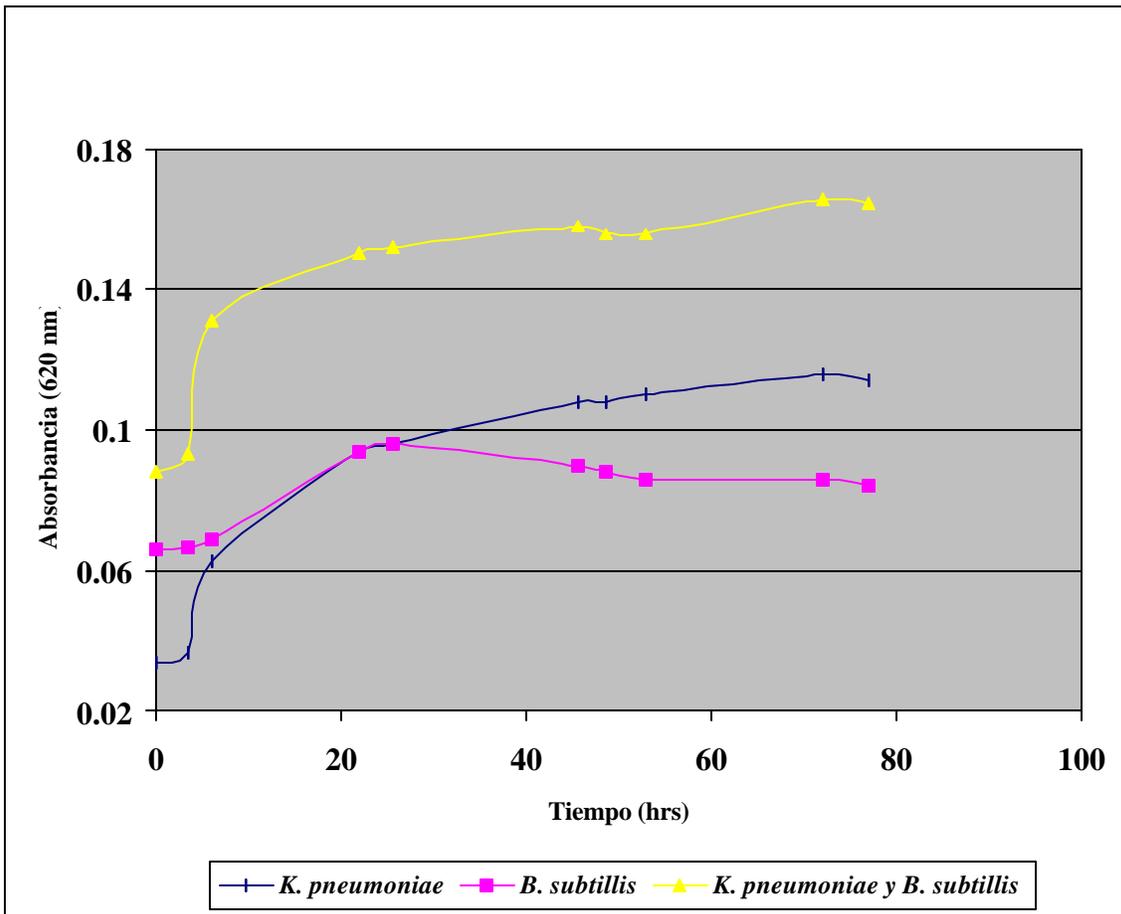


Gráfico 6.4. Curvas de crecimiento bacteriano de *K. pneumoniae*, *B. subtilis* y del cultivo mixto cuando crecieron sin cadmio.

Aquí apreciamos que la cepa *K. pneumoniae* y el cultivo mixto presentan un comportamiento muy similar, mientras que *B. subtilis*, a pesar de presentar una curva de crecimiento representativa, muestra una fase exponencial mas corta y una fase estacionaria con una ligera disminución en el número de células presentes.

Las comparaciones entre las curvas de crecimiento de *K. pneumoniae*, *B. subtilis* y el cultivo mixto crecidas en medio con cadmio se muestran a continuación:

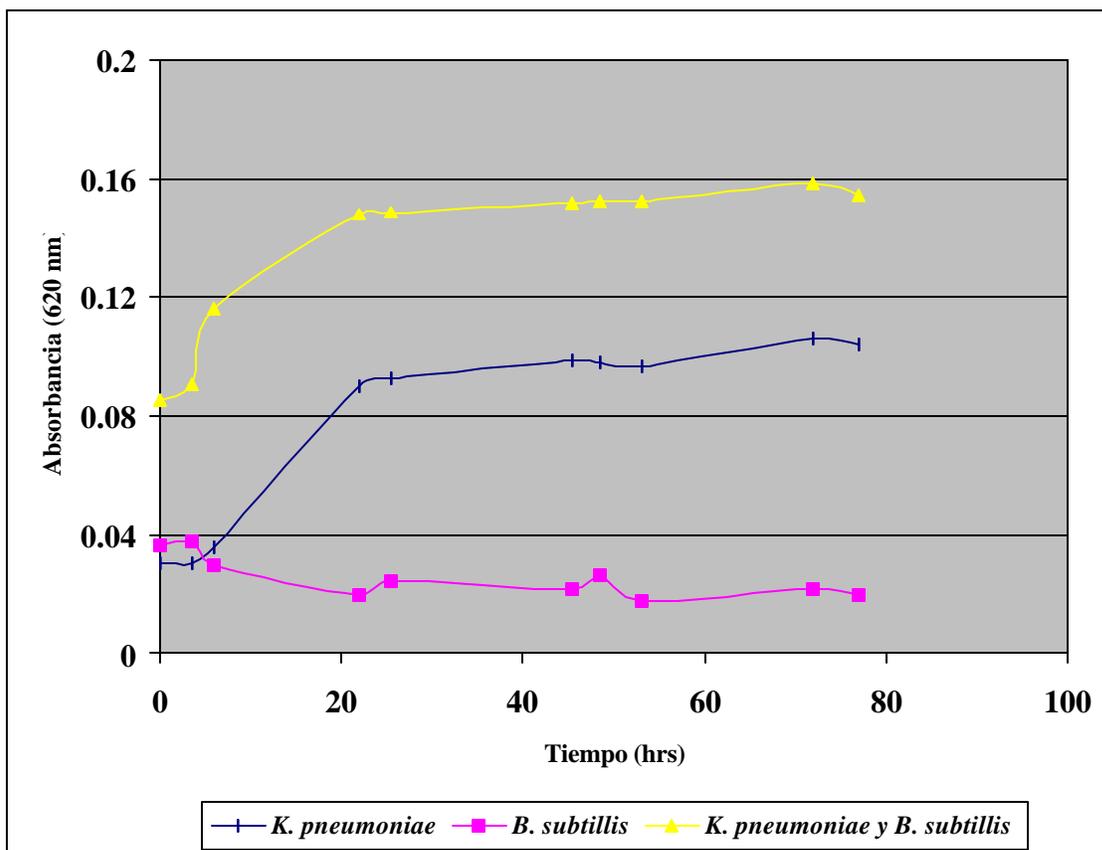


Gráfico 6.5. Curvas de crecimiento bacteriano de *K. pneumoniae*, *B. subtilis* y el cultivo mixto en medio con cadmio.

Igual que el caso anterior, *K. pneumoniae* y el cultivo mixto se comportan de manera muy similar, no así *B. subtilis* en el cual se aprecia una marcada sensibilidad al cadmio, ya que las células bacterianas mueren inmediatamente después de entrar en contacto con el metal.

6.3 DETERMINACION DE CINETICAS DE INMOVILIZACION DEL CADMIO BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO.

En la tabla 6.8 pueden observarse las concentraciones finales de cadmio, así como el porcentaje de inmovilización respectivo, presentados para *K. pneumoniae*, *B. subtilis* y el cultivo mixto.

Tiempo (hrs)	<i>B. subtilis</i>		<i>K. pneumoniae</i>		ambas cepas	
	[cadmio]	% inmovilización	[cadmio]	% inmovilización	[cadmio]	% inmovilización
0	2.0000	0	2.0000	0	2.0000	0
0.5	1.1845	40.78	1.3680	31.60	1.3165	34.18
6.0	1.5690	21.55	1.5880	20.60	1.3850	30.75
25.5	1.4190	29.05	1.4985	25.08	1.3035	34.83
45.5	1.5825	20.88	1.7005	14.98	1.4455	27.73
53.0	1.6145	19.28	1.6920	15.40	1.4490	27.55
77.0	1.6850	15.75	1.6830	15.85	0.9440	52.80

Tabla 6.8. Concentraciones de cadmio determinadas en el sobrenadante de los cultivos y porcentaje de inmovilización para *B. subtilis*, *K. pneumoniae* y el cultivo mixto.

En la gráfica siguiente, puede apreciarse una comparación en las curvas de inmovilización de cadmio representadas para estas cepas. Como se observa las tres curvas

de inmovilización presentan un comportamiento muy similar, representando un decremento importante en la primera media hora, a partir de las cuales hay un ligero incremento y posteriores fluctuaciones pequeñas.

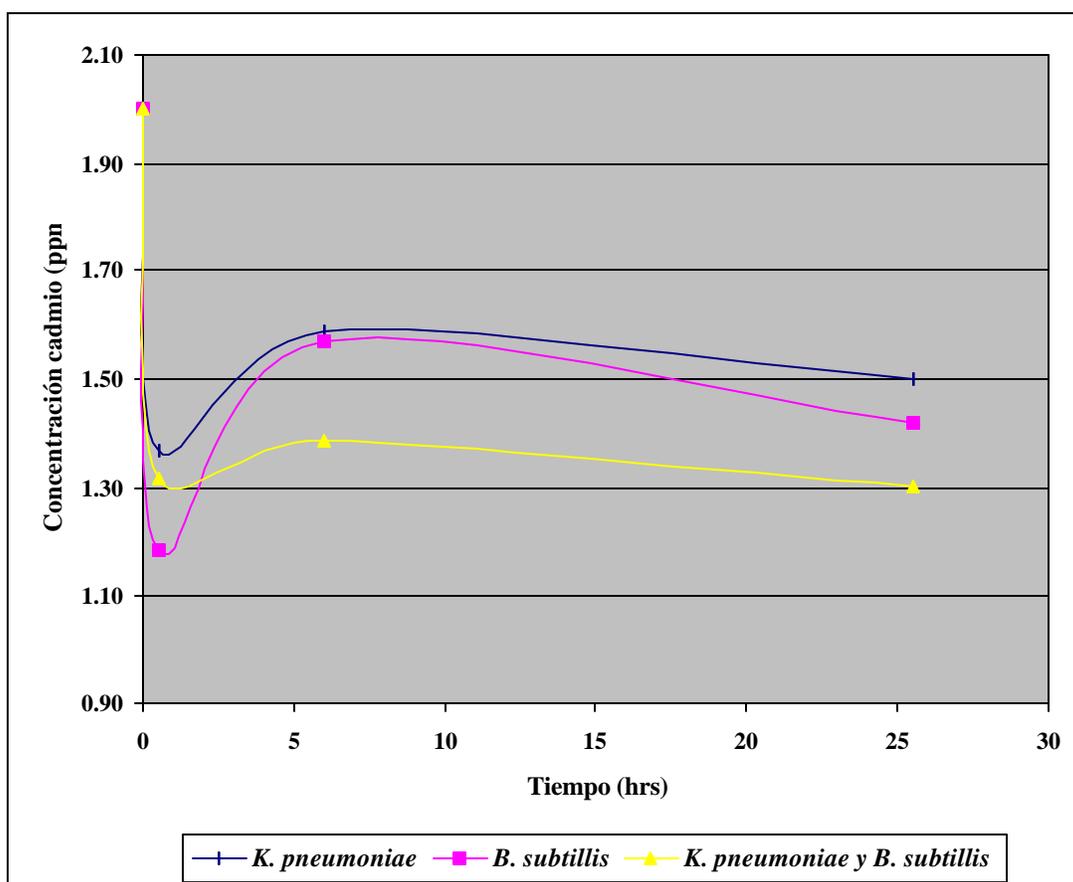


Gráfico 6.6. Curvas de inmovilización de cadmio para *K. pneumoniae*, *B. subtilis* y el cultivo mixto.

6.4 CORRELACION ENTRE ABSORBANCIA Y NUMERO DE CELULAS

La tabla 6.9 muestra los datos de número de células y absorbancia para la cepa *K. pneumoniae*, tomadas en tres diferentes tiempos.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Tiempo (hrs)	Absorbancia (620 nm)	Número de células
16	0.084	6.30×10^6
20	0.096	9.60×10^6
24	0.119	1.57×10^7

Tabla 6.9. Datos de número de células y absorbancia para *K. pneumoniae*

Graficando los valores de la tabla 6.9, se obtiene el gráfico mostrado a continuación:

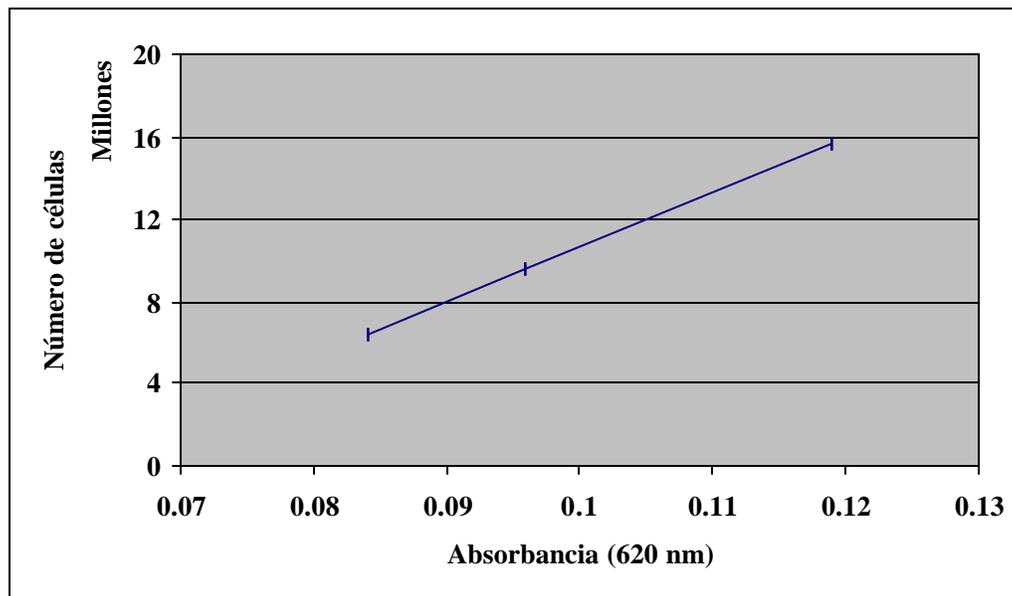


Gráfico 6.7. Correlación entre absorbancia y número de células para *K. pneumoniae*

Graficando absorbancia contra el número de células, se observa una recta común dada por tres puntos, que va a servir para obtener los valores del número de células respectivos a cada una de las absorbancias medidas para *K. pneumoniae* en ausencia de cadmio.

En la siguiente tabla se observan los valores de absorbancia y número de células, que se obtuvieron extrapolando los valores de absorbancia en la gráfica 6.7, así como el valor para el logaritmo del número de células.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
Tiempo (hrs)	Absorbancia (620 nm)	Número de células	Logaritmo No. Células
6.0	0.063	7.02×10^5	5.85
22.0	0.094	9.01×10^6	6.95
25.5	0.096	9.55×10^6	6.98
45.5	0.108	1.28×10^7	7.11
48.5	0.108	1.28×10^7	7.11
53.0	0.110	1.33×10^7	7.12
72.0	0.116	1.50×10^7	7.17
77.0	0.114	1.44×10^7	7.16

Tabla 6.10. Valores de Absorbancia, Número de Células y logaritmo de Número de células para *K. pneumoniae* en tiempos determinados en ausencia de cadmio.

La siguiente gráfica muestra la curva de crecimiento para *K. pneumoniae*, graficando el número de células contra el tiempo.

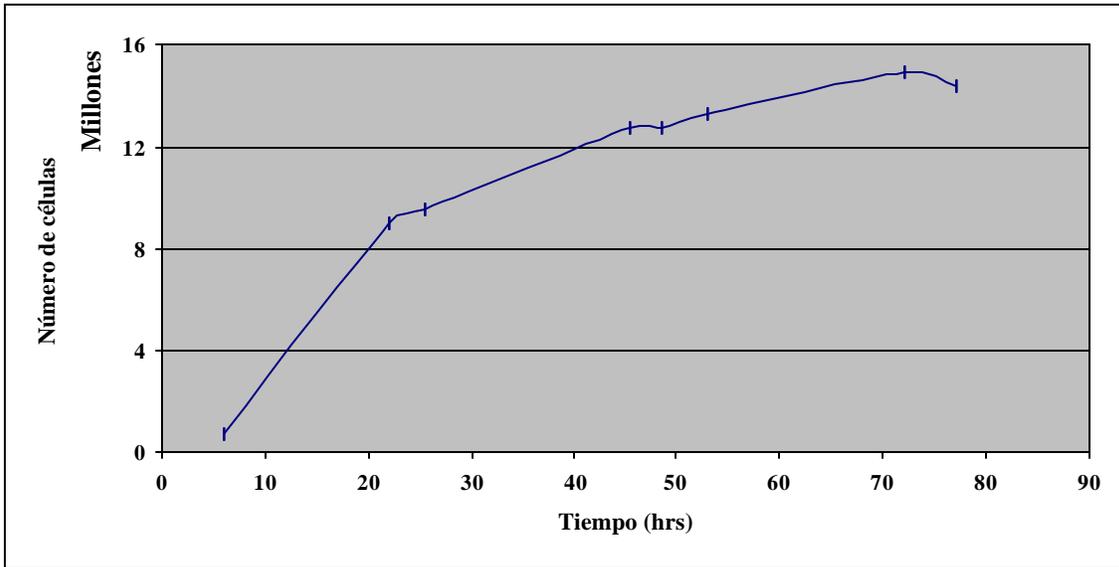


Gráfico 6.8. Curva de crecimiento de *K. pneumoniae*

Analizando la fase exponencial de esta curva de crecimiento se pudo obtener el tiempo de generación para esta cepa bajo las condiciones de cultivo ya especificadas, el cual fue de 1 hora y 30 minutos aproximadamente.