



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Diseño de un sistema de remediación de cadmio en suelos
mediante bioaumentación de levaduras**

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de:

BIÓLOGO

Autor: Romero Aguilar, Marco Vinicio

Director: Aguirre Chamba, Paulina Isabel

LOJA

2023



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2023

Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular

Loja, 9 de enero del 2023

Doctor,

Darío Javier Cruz Sarmiento

Director de la carrera de Biología

Loja.-

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: Diseño de un sistema de remediación de cadmio en suelos por bioaumentación de levaduras realizado por Marco Vinicio Romero Aguilar ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: PhD, Paulina Isabel Aguirre Chamba.

C.I.: 1104265226

Correo electrónico: piaguirre@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Marco Vinicio Romero Aguilar, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor (a) del Trabajo de Integración Curricular denominado: Diseño de un sistema de remediación de cadmio en suelos mediante bioaumentación de levaduras, de la carrera de Biología específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Marco teórico, Metodología, Resultados, Discusiones, Conclusiones y Recomendaciones, siendo Paulina Isabel Aguirre Chamba, directora del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autor: Marco Vinicio Romero Aguilar

C.I.: 0705911725

Correo electrónico: marcoromero0@hotmail.com

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia y amigos, en especial a mis padres y hermanas, quienes son mi inspiración en muchos sentidos y parte fundamental de mi vida.

Agradecimiento

Agradezco a mi padre y a mi madre por apoyarme y animarme a estudiar algo que me apasiona y a mis hermanas que a lo largo de todo este tiempo me han apoyado de una u otra forma y nunca dejaron de animarme para seguir avanzando.

A mi directora de tesis, que fue mi guía y brindó consejos y ánimos cuando los necesitaba.

Y a mis compañeros y amigos cercanos por estar ahí, apoyarme y ser esa fuente de distracción en los momentos difíciles.

Índice de contenido

Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de contenido	VII
Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo uno.....	6
Marco teórico	6
1.1 El cadmio: causas y consecuencias en el ambiente	6
1.2 Problemática en Ecuador	7
1.3 Remediación de cadmio en suelos	8
1.4 Factores que influyen en la adsorción de metales pesados.....	10
Capítulo dos	11
Metodología.....	11
2.1 Obtención y preparación del suelo.....	11
2.2 Obtención y cultivo de levaduras	11
2.3 Pruebas de tolerancia.....	12
2.4 Cálculo de los parámetros cinéticos de las levaduras.....	12
2.5 Pruebas de adsorción.....	13

2.6	Cálculo de la efectividad de remoción del cadmio	14
2.7	Isotermas de adsorción	15
2.8	Análisis estadísticos.....	15
Capítulo tres.....		16
Resultados		16
3.1	Caracterización del suelo	16
3.2	Pruebas de tolerancia.....	16
3.3	Porcentaje de remoción.....	17
3.4	Isotermas de adsorción	19
Capítulo cuatro.....		21
Discusión.....		21
4.1	Pruebas de tolerancia.....	21
4.2	Porcentaje de remoción.....	21
4.3	Isotermas de adsorción	22
Conclusiones		24
Recomendaciones		25
Referencias		26
Apéndice.....		32
Apéndice A. Gráficos de las medias del Cd removido entre los tratamientos		32

Índice de tablas

Tabla 1 Parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> antes y después de su adaptación al Cd	17
Tabla 2 Porcentaje de remoción final en cada tratamiento	19
Tabla 3 Constantes de las respectivas isothermas en base a los resultados de adsorción de Cd en suelo por parte de <i>S. cerevisiae</i>	19

Índice de figuras

Figura 1 Esquema del biorreactor empleado en el experimento de adsorción	13
Figura 2 Resultado de las pruebas de tolerancia inicial	16
Figura 3 Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> post adaptación al Cd	17
Figura 4 Cinética de remoción de Cd bajo una aireación de 6.5 L/min	18
Figura 5 Cinética de remoción de Cd bajo una aireación de 1 L/min	18

Resumen

La contaminación por metales pesados es un grave problema a nivel mundial. Se han reportado concentraciones significativas de metales pesados en suelos agrícolas. En Ecuador, el cadmio representa un riesgo para los cultivos de cacao, uno de los principales productos de exportación del país. El objetivo es de eliminar o reducir las concentraciones de Cd en suelos por medio de pruebas de laboratorio donde se inocularon levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), las mismas que fueron expuestas a varias concentraciones de Cd junto con diferentes niveles de aireación para determinar cómo se desarrolla mejor el proceso de bioadsorción. Los resultados se evaluaron por medio de pruebas de absorción atómica, junto con ensayos DRX y FDX de las muestras de suelo tratadas, los datos obtenidos se analizaron por medio de un ANOVA. Los resultados contribuirán a desarrollar una estrategia para disminuir las concentraciones de cadmio en suelos agrícolas

Palabras clave: *S. cerevisiae*, cadmio, remediación.

Abstract

Heavy metals represent a serious environmental problem. In Ecuador, cadmium has been widely reported in agricultural soils and represents a risk to crop trade and consumer health. This work focused on removing or reducing cadmium concentrations in soils using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). The removal capacity was evaluated in vessels aerated at 6.5 L/min and at 1 L/min, with 0.5 kg soil containing 2 ppm Cd. The yeasts were inoculated into the soil at various time intervals and soil samples were taken at 0, 1, 2 and 6 hours. The soil samples were analyzed by atomic adsorption to calculate the percentage of removal, in addition, Langmuir and Freundlich isotherms were performed with the data obtained in the removal of Cd from the soil. A maximum removal percentage of 64% was obtained by applying yeasts and an air flow of 1 L/min. Although no significant differences were observed between treatments, *S. cerevisiae* showed potential for Cd remediation in soils.

Keywords: *S. cerevisiae*, cadmium, remediation.

Introducción

La contaminación ambiental se ha convertido en uno de los problemas más graves en la actualidad (Oyewole et al., 2019). Los metales pesados son unos de los contaminantes más tóxicos (Qayyum et al., 2020) y su presencia sigue aumentando en los ecosistemas (Tang et al., 2019). Estos se caracterizan por su alta densidad (Adagunodo et al., 2018) persistencia y difícil remediación (Khan et al., 2015; Rajendran et al., 2022). Afectan principalmente al suelo y sus fuentes son principalmente antrópicas (Masindi y Muedi, 2018).

Uno de los metales pesados más reportados en suelos es el cadmio (Cd) (Adagunodo et al., 2018). En Sudamérica se ha registrado Cd en concentraciones más altas de lo normal en varios suelos agrícolas (Khan et al., 2017). En Ecuador, uno de los cultivos que más se relaciona con la presencia de Cd en suelos es el cacao (Rofner, 2021). Dada la importancia de este cultivo agrícola para el país (INEC, 2020), la presencia de Cd en suelos representa un riesgo para su comercio y salud de los consumidores (Hayat et al., 2019).

En vista de esto, se han desarrollado varias alternativas para tratar la contaminación de metales pesados, entre ellas la biorremediación, la cual es una ciencia que permite el tratamiento de ambientes contaminados por medio de organismos vivos o sus derivados (Kumar et al., 2021). Esta puede ser aplicada para tratar varios ambientes con enfoques *in situ* o *ex situ* (Kapahi y Sachdeva, 2019) y se puede desarrollar empleando diversos organismos, siendo *Saccharomyces cerevisiae* uno de los más estudiados en remediación de Cd (Vasudevan et al., 2003; Massoud et al., 2019).

La levadura *S. cerevisiae*, comúnmente conocida por emplearse en la industria cervecera y panadera, es considerada un buen adsorbente de metales pesados (Massoud et al., 2020). Gracias a sus características como: rápida producción de biomasa, alta capacidad de sorción (Huang et al., 2020), fácil manipulación y bajo costo de producción (Massoud et al., 2019); es considerada una exitosa biorremediadora de metales. Sin embargo, a pesar de los diversos estudios sobre su capacidad de remoción, aún son necesarias más investigaciones para el desarrollo de un sistema de biorremediación efectivo y aplicable al tratamiento de suelos *in situ* o a gran escala.

En base a lo descrito anteriormente, este trabajo tiene como objetivo el desarrollo de una estrategia de biorremediación mediante bioaumentación de levaduras, que permita remover o inmovilizar las concentraciones de cadmio en suelos. También se plantea evaluar la influencia de la aireación en el proceso de sorción. En este sentido, se espera que la inoculación de *S. cerevisiae* junto con los tratamientos de aireación a las muestras de suelo contaminado, permitan eliminar o disminuir las concentraciones de cadmio en ellas gracias a la capacidad de estas levaduras de retener al Cd en sus células.

OBJETIVOS

Objetivo General.

- Remover o inmovilizar Cd en suelo de cultivos de cacao usando *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos Específicos.

- Construir un sistema de remediación de cadmio usando *Saccharomyces cerevisiae*.
- Determinar la cantidad de aire requerido para el sistema de bioaumentación.
- Determinar el contenido de cadmio bioadsorbido por los microorganismos.

Capítulo uno

Marco teórico

1.1 El cadmio: causas y consecuencias en el ambiente

El Cd es etiquetado como un importante contaminante (Chellaiah, 2018). Es un metal pesado altamente biopersistente, con la capacidad de causar efectos tóxicos a largo plazo incluso en bajas concentraciones (Haider et al., 2021). Tiene una gran movilidad en los ecosistemas y es altamente asimilable por los organismos (Dong et al., 2019). Un ejemplo de esto es su capacidad para reemplazar a minerales como el calcio, lo que facilita su ingreso a plantas y animales (Kubier et al., 2019).

El Cd es capaz de impactar en todos los componentes medioambientales (Chellaiah, 2018). Sin embargo, el suelo es el principal afectado por su contaminación, el cual es considerado un sumidero de contaminantes (Kubier et al., 2019). El Cd, por su naturaleza inorgánica tiende a acumularse en los suelos sin sufrir ningún tipo de degradación química o microbiana (Kubier et al., 2019). Lo que produce en una continua acumulación de este metal y una alta disponibilidad a lo largo del tiempo. La presencia de Cd en suelos es causada por varios factores. De acuerdo con Haider et al. (2021), su contaminación está influenciada principalmente por fuentes antropogénicas, aunque también puede deberse a causas naturales. Algunas de las fuentes de Cd más comunes son las actividades industriales, minería, quema de combustibles, aguas residuales, entre otras (Bigalke et al., 2017). Una actividad menos conocida a la que se le atribuye el aumento de Cd en suelos es la aplicación de fertilizantes inorgánicos, especialmente los que contienen fosfato sintético. Algunos estudios como los realizados por Azzi et al. (2017) y Kubier et al. (2019) han determinado que este tipo de fertilizantes pueden contener Cd a modo de impurezas, elevando su concentración en suelos y aguas cercanas. Aun así, no se conoce del todo el porcentaje de aporte de metales pesados por parte de este tipo de fertilizantes.

Este metal pesado tiene un efecto importante en la salud de los seres humanos y en la de los organismos en general, principalmente debido a su alta toxicidad y movilidad en el ambiente (Chen et al., 2016). Hayat et al. resumen los efectos derivados de la toxicidad del

Cd en afecciones al sistema respiratorio, esquelético, reproductivo y a los riñones (2019). También se hace referencia a este metal como un importante cancerígeno (McLaughlin et al., 2021). Los principales factores de riesgo son la exposición directa y la ingesta de alimentos o aguas contaminadas (Kubier et al., 2019; Zhang y Reynolds, 2019).

Otro importante efecto de la presencia de Cd en suelos es la reducción de la tierra cultivable y una inseguridad alimenticia que afecta principalmente a los países en desarrollo (Haider et al., 2021; Hussain et al., 2021). Por otro lado, también tiene un efecto negativo en la eliminación de los contaminantes orgánicos, ralentizando su degradación natural en los suelos (Mondal et al., 2020). En sí, la presencia de cadmio en los ecosistemas no sólo representa un riesgo directo para los seres humanos, sino que también afecta indirectamente al deteriorar la calidad de los suelos y alterar sus dinámicas.

1.2 Problemática en Ecuador

Ecuador, al igual que otros países, es afectado por la contaminación de Cd. Un problema que gana cada vez más atención es la presencia de Cd en suelos y granos de cacao (Romero-Estévez et al., 2019) y la consecuente elaboración de chocolate cargado de Cd (Abt et al., 2018). Un problema latente, considerando los efectos que puede tener el Cd en el cuerpo humano y la relevancia del cacao para el país.

En Ecuador, el cacao es uno de los cultivos más importantes, con un gran impacto en términos culturales y económicos (Salazar et al., 2018). Según Chavez et al. (2016), el cacao posee una de las extensiones de cultivo más grandes del país. Además, Ecuador se ha convertido en uno de los principales productores de cacao en Latinoamérica y el mundo (ICCO, 2022), y el primer productor de cacao de aroma de alta calidad (Samaniego et al., 2020). Ecuador es conocido por producir dos variedades principales de cacao, la “variedad CCN-51” y el “cacao nacional de fino aroma”, el cual posee una alta demanda a nivel europeo (Barraza et al., 2021).

El Cd puede afectar directamente al cultivo de cacao al causar daños físicos en las plantas (Haider et al., 2021), sin embargo, también podría tener un efecto negativo en su comercio. Kubier et al. (2019) determinó que las concentraciones de Cd en granos de cacao

producidos en Ecuador eran mayores al compararlos con cultivos de otras regiones. Adicionalmente, los valores de Cd en el cacao ecuatoriano llegan a superar el valor crítico establecido por la Unión Europea, de 0.6 mg Cd/Kg (Chávez et al., 2015; como se citó en Kubier et al., 2019), el cual se volvió más estricto partir de 2019 (Barraza et al., 2021). Esto último refleja la creciente importancia que se le está dando a la contaminación por Cd y las posibles implicaciones que esto puede tener en el comercio del cacao. De igual manera, esta situación se puede estar repitiendo con otros cultivos en el país, lo que representaría un grave riesgo para la salud de sus consumidores.

1.3 Remediación de cadmio en suelos

Existen varios enfoques de remediación de Cd, generalmente enfocados hacia procesos físicos o químicos, como el lavado de suelos, reducción catalítica, tratamientos térmicos estabilización, electrorremediación, entre otras (Raj y Maiti, 2019). Muchas de estas estrategias presentan algunos problemas por su alto costo o la generación de contaminantes secundarios, como lodos cargados con contaminantes (Yin et al., 2019).

Varios procesos de remediación enfocados en la aplicación de organismos o alguno de sus derivados surgen como alternativa a los procesos convencionales (Ismael et al., 2019). Estos procesos biológicos se caracterizan gracias a su bajo precio, efectividad y el reducido impacto que estos tienen en el ambiente (Yin et al. 2019), además de presentar ventajas sociales y ecológicas (Jin et al., 2018).

Dentro de la biorremediación, un enfoque para la eliminación de contaminantes es la aplicación de microorganismos como algas, bacterias u hongos (Kumar et al., 2021). Este es un enfoque que gana cada vez más interés por sus ventajas y por la capacidad de tratar la contaminación de variadas formas (Jin et al., 2018). Dentro de los microorganismos, los hongos son considerados un candidato prominente para ser empleado en biorremediación por algunos autores. Khan et al. mencionan que la alta tolerancia a los metales pesados y la relación superficie-volumen presente en los hongos hacen de estos una excelente opción para tratar este tipo de contaminación (2019).

La aplicación de hongos en procesos de biorremediación se denomina micorremediación, y se basa en la aplicación de biomasa viva o muerta para la reducción del contaminante, principalmente mediante procesos de biosorción, bioacumulación o biovolatilización (Igiri et al., 2018; Chellaiah, 2018). Autores como Khan et al. (2019) señalan que una de las principales ventajas de emplear hongos es su capacidad de adaptarse a los contaminantes y a las condiciones del sitio, lo que hace factible realizar tratamientos in situ. Muchos hongos han sido estudiados por su capacidad de absorber metales pesados, entre ellos *S. cerevisiae*. Varios autores han expuesto la facultad de esta levadura para tratar la contaminación de metales pesados como el cromo, mercurio, níquel, arsénico, cadmio, entre otros (Damodaran et al., 2011; Massoud et al., 2019; Huang et al., 2020; De Rossi et al., 2020)

S. cerevisiae es un hongo unicelular del grupo de las levaduras de un tamaño aproximado de 5 - 10 μm con la capacidad de emplear varias fuentes de carbono como fuente de energía, dependiendo de si el desarrollo es anaeróbico o aeróbico (Parapouli et al., 2020). El principal mecanismo de interacción entre la levadura y los metales pesados está mediado por su pared celular, la cual termina por adsorber los iones de elementos como el Cd (Huang et al., 2020). Los procesos que permiten la adsorción de metales pesados como el Cd en varios hongos y levaduras están mediados por procesos físicos de contacto y por fuerzas electrostáticas entre los iones del metal y la pared celular (Priya et al., 2022). Y, si bien la capacidad de adsorción de *S. cerevisiae* es menor en comparación con otros microorganismos, algunos autores la destacan por sobre el resto. Massoud et al. (2019) indican que, si bien esta levadura posee una capacidad de sorción cuestionable, resalta gracias a características como, su fácil cultivo y gran capacidad de producir biomasa, el bajo costo que esta posee, fácil manipulación a nivel molecular y la posibilidad de ser obtenida en grandes cantidades de industrias como la cervecera. La capacidad de aprovechar un material de desecho como la biomasa de levaduras y emplearlo para tratar ambientes contaminados representa una gran ventaja hacia otros organismos, porque permitirá utilizar algo que en principio parecía inservible de forma más eficiente y amigable con el medio ambiente.

1.4 Factores que influyen en la adsorción de metales pesados

La biosorción de iones metálicos se puede dar a través de varios mecanismos dependiendo del microorganismo empleado, pero existen varios factores que pueden alterar este proceso. Autores como Massoud et al. (2019) y Oyewole et al. (2019) señalan que los principales factores que determinan la eficiencia de remoción son temperatura, pH, velocidad de inoculación, competencia de iones metálicos y la concentración del metal. Por otro lado, Damodaran et al. (2011) estudiaron la influencia de la aireación, y concluyó que también era un factor relevante, ya que favorecía la producción de biomasa y por ende aumentaba la tasa de biosorción del metal. También es posible que exista algún tipo de competencia o relación entre las levaduras y los microorganismos originales del suelo a tratar, por lo que sería interesante estudiar las posibles interacciones entre ambos. Abatenh et al. (2017) indican que los factores biológicos como las interacciones y competencias por recursos con otros microorganismos del suelo juegan un papel importante durante procesos de biorremediación.

Capítulo dos

Metodología

2.1 Obtención y preparación del suelo

Se colectó 20 kg de suelo procedentes de una zona agrícola en el cantón Piñas, se colocaron en recipientes de plástico y se almacenaron a temperatura ambiente hasta los análisis posteriores. El suelo fue colectado en temporada seca, por lo que no hizo falta eliminar el exceso de agua en la estufa. Se realizaron análisis fisicoquímicos para caracterizar las principales propiedades del suelo: textura, pH, materia orgánica, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico (Damodaran et al., 2011), todo esto se realizó por medio de los métodos descritos en Bazan (2017). Por otro lado, se cuantificó la cantidad de Cd en el suelo por medio de pruebas de espectroscopía de absorción atómica (AAS) en un equipo marca Perkin Elmer modelo AAnalyst400. Para ello se homogeneizó el suelo por roleo y se aplicó la técnica del cuarteo (Yu y Flury, 2021), se obtuvieron seis muestras y se obtuvo un promedio del Cd presente en cada una. El suelo restante se preparó para las pruebas de remoción, se tamizó para obtener un tamaño de partículas de 2 mm por medio de un tamiz vibrador Retsch modelo AS 200 y posteriormente luego se colocó en la estufa a 50 ° C por 42 horas con la finalidad de reducir la cantidad de microorganismos presentes en él.

2.2 Obtención y cultivo de levaduras

Las levaduras se obtuvieron por medio de un sobre comercial de levadura activa seca para pan de la marca “La Reposterita”, el mismo que fue conseguido en la ciudad de Loja. Posteriormente, las levaduras secas se activaron en un medio líquido YPD compuesto por 3 gL⁻¹ de extracto de levadura, 5 gL⁻¹ de peptona, 20 gL⁻¹ de dextrosa, con un pH de 5.5 (Damodaran et al., 2011). Una vez activadas las levaduras, se realizaron réplicas cada 2–3 días para mantener al microorganismo en óptimas condiciones. Para ello se tomó 5 ml del cultivo madre y se inoculó en 45 ml de medio YPD previamente esterilizado. Todos los medios de cultivo se realizaron en matraces de 250 ml y se mantuvieron en un cuarto aclimatado a una temperatura de 29 ° C ± 1 ° C y en agitación constante a 180 rpm por medio de un agitador circular de la marca Labnet modelo Orbit 1900.

2.3 Pruebas de tolerancia

Para evaluar la tolerancia de las levaduras se evaluó su crecimiento en medios YPD. Para ello se preparó una solución inicial de 1000 ppm de cadmio a partir de sulfato de Cd (CdSO_4) y se realizaron diluciones en el medio YPD hasta conseguir diferentes concentraciones (Huang et al., 2020). En un principio se evaluó el crecimiento de las levaduras a 2.7, 5.4 y 8 ppm y posteriormente solo a 5 ppm, esto debido a la baja tolerancia inicial al Cd y a la baja cantidad de Cd presente en suelos agrícolas. Para ello se cultivaron en medio YPD con las concentraciones de Cd descritas anteriormente, se tomaron muestras a las 0, 12 y posteriormente cada 3 horas hasta un tiempo total de 30 horas. El crecimiento de las levaduras se analizó en función de la turbidez, donde se midió la absorbancia por medio de celdas de cuarzo a 600 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Spectronic modelo BioMate 3 (Ali et al., 2016). La absorbancia obtenida se transformó a masa de levaduras en gramos por litro por medio de una curva de calibración que relacionaba una masa conocida de levaduras y su respectiva absorbancia. Las pruebas de crecimiento se realizaron por triplicado con duplicado analítico.

Para realizar las curvas de calibración se tomó una muestra de un cultivo de levaduras con un tiempo de crecimiento de 24 horas, se realizaron diluciones seriadas y se midieron sus absorbancias como se describió anteriormente. Al mismo tiempo, se calculó la biomasa presente en cada una de las diluciones como se describe a continuación: se centrifugó 40 ml del cultivo inicial por 5 min a 4000 rpm en una centrífuga modelo Z 326 K marca Hermle. La biomasa de las levaduras precipitadas (pellet) se extrajo y se secó en una estufa por 2 horas a 105°C . Una vez seca, se pesó la biomasa y se calculó la cantidad de biomasa presente en las diluciones multiplicando la biomasa inicial por cada factor de dilución.

2.4 Cálculo de los parámetros cinéticos de las levaduras

Para evaluar el crecimiento de las levaduras se calculó su productividad volumétrica y la tasa específica de crecimiento. La fórmula empleada para el cálculo de la productividad volumétrica fue la siguiente:

$$Pb = \frac{Masa\ Final - Masa\ Inicial}{Tiempo}$$

Donde se tomó la masa como la concentración de levaduras en el medio, expresadas en g/L. La concentración de las levaduras en el medio se calculó empleando una curva de calibración que relaciona la absorbancia con la masa. Por otro lado, la tasa específica de crecimiento se obtuvo por medio de la siguiente fórmula:

$$u = \frac{\ln(Masa\ Final) - \ln(Masa\ Inicial)}{Tiempo}$$

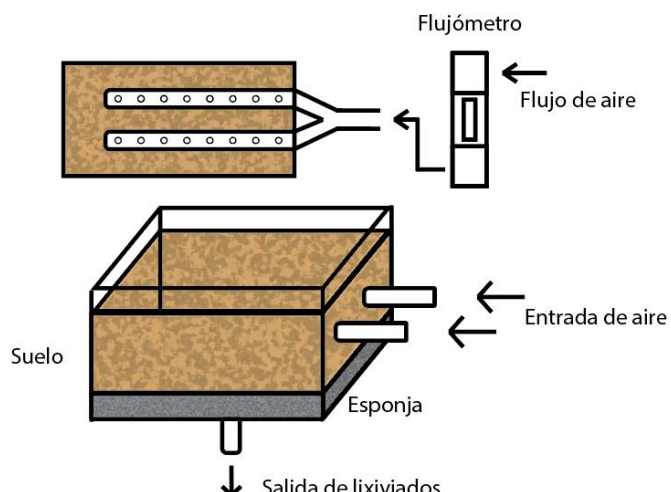
Donde el resultado obtenido se expresa en unidades de tiempo (h^{-1}) y representa la velocidad de crecimiento por unidad de biomasa.

2.5 Pruebas de adsorción

Para las pruebas de adsorción de cadmio se aplicaron dos tratamientos, uno con 2 ppm y el tratamiento control. Primero, el suelo previamente preparado se mezcló homogéneamente con soluciones preparadas a partir de la solución de 1000 ppm, por las cuales se añadió 2 mg de Cd a cada kg de suelo para lograr una concentración de Cd de 2 ppm y se dejó secar por 48 horas al ambiente para eliminar el exceso de agua (Damodaran et al., 2011). Posteriormente, se colocó 0.5 kg de suelo en recipientes de plástico adaptados con una fuente de aire como se muestra en la Figura 1.

Figura 1

Esquema del biorreactor empleado en el experimento de adsorción



Nota. Modelo basado en el diseñado por Damodaran et al. (2011).

Una vez preparado el suelo, se inocularon las levaduras rociando 250 ml del medio líquido previamente cultivado y con las levaduras en la fase exponencial (Damodaran et al., 2011; Ali et al., 2016). Una vez inoculado el suelo, se siguió añadiendo 100 ml del cultivo 30 minutos antes de la toma de muestras para obtener lixiviados, los mismos que se recircularon 2 veces. También se evaluó el efecto de la aireación en la efectividad de remoción por medio de dos tratamientos, a 6.5 y 1 litro por minuto, esto se realizó por medio de flujómetros que controlaban el ingreso de aire a los recipientes.

2.6 Cálculo de la efectividad de remoción del cadmio

La efectividad de remoción de Cd se evaluó al igual que Damodaran et al. (2011). Para calcular la cantidad de cadmio residual en el suelo se tomaron muestras de aproximadamente 2 g de al menos 5 zonas aleatorias del recipiente con la ayuda de una espátula desinfectada. La toma de muestras se realizó en el tiempo 0, 1, 2 y 6 horas de haber iniciado con la primera inoculación. Las muestras de suelo recolectadas se secaron a 30 °C para el posterior análisis de AAS y cuantificación de Cd. El porcentaje de remoción se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Remoción} = \frac{Cd \text{ inicial} - Cd \text{ final}}{Cd \text{ inicial}} * 100$$

2.7 Isotermas de adsorción

Se realizaron isotermas de adsorción empleando los modelos de Freundlich y Langmuir con los datos obtenidos del experimento de remoción en suelos. Las isotermas y el cálculo de los parámetros de las mismas se realizaron como se describe en Massoud et al. (2020).

2.8 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa R-studio. Se utilizó una prueba T pareada para determinar diferencias significativas entre la concentración de cadmio inicial y la final. Por otra parte, para analizar el efecto del aire y tratamiento sobre la remoción total de cadmio se utilizó una prueba T de Student, debido a que los datos presentaron una distribución normal según la prueba de Shapiro-Wilk ($p\text{-valor} > 0.05$), donde la variable dependiente corresponde a la diferencia entre la concentración inicial y final de cadmio, y la independiente el aire y el tratamiento.

Capítulo tres

Resultados

3.1 Caracterización del suelo

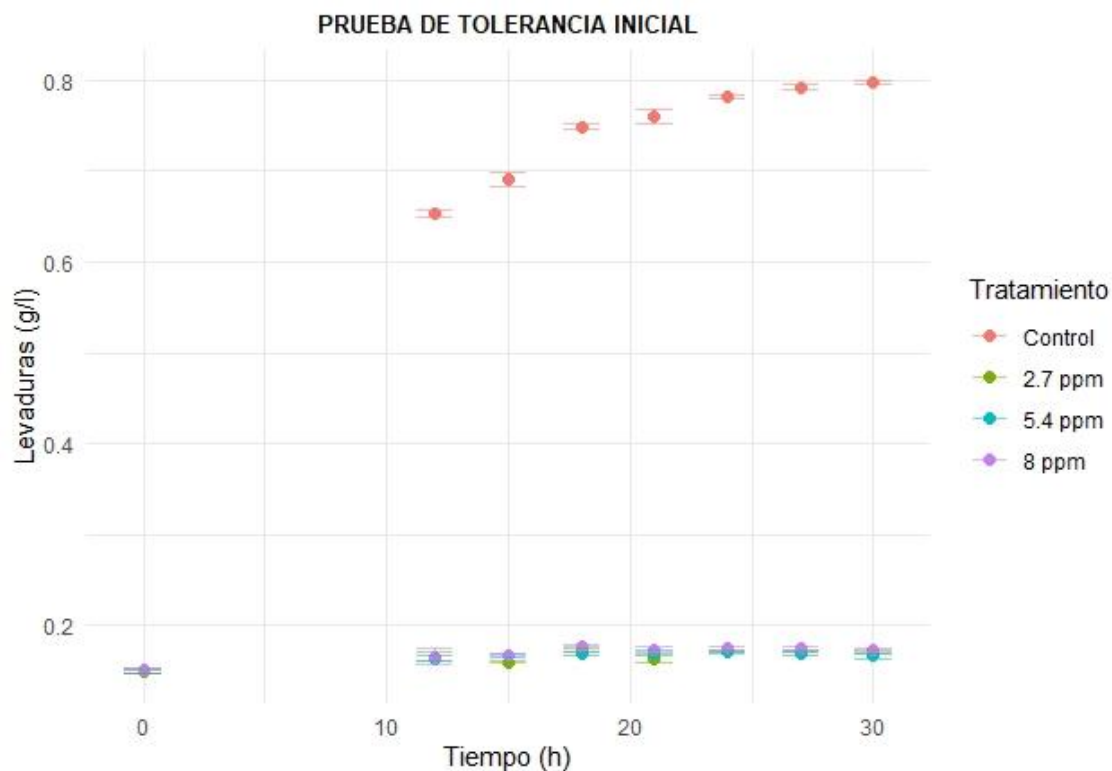
Los análisis fisicoquímicos determinaron que el suelo empleado poseía una textura franco-arenosa con un pH de 5.99 y una conductividad eléctrica de 223 $\mu\text{S}/\text{cm}$. También se obtuvo una capacidad de intercambio catiónico de 11.61 meq/100 g y un porcentaje de materia orgánica del 0.52%.

3.2 Pruebas de tolerancia

El análisis de tolerancia inicial mostró una alta toxicidad provocada por el Cd, incluso en las concentraciones menores. El crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* empleada se inhibió prácticamente por completo (Figura 2) en todos los tratamientos en relación con el control.

Figura 2

Resultado de las pruebas de tolerancia inicial



Nota. Crecimiento de la cepa empleada antes de ser adaptada al Cd. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE.

Adicionalmente, esta cepa de levaduras mostró una tasa específica de crecimiento de $0.112 \text{ h}^{-1} \pm 0.011$ y una productividad volumétrica de $0.58 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (Tabla 1).

Tabla 1

Parámetros cinéticos de S. cerevisiae antes y después de su adaptación al Cd

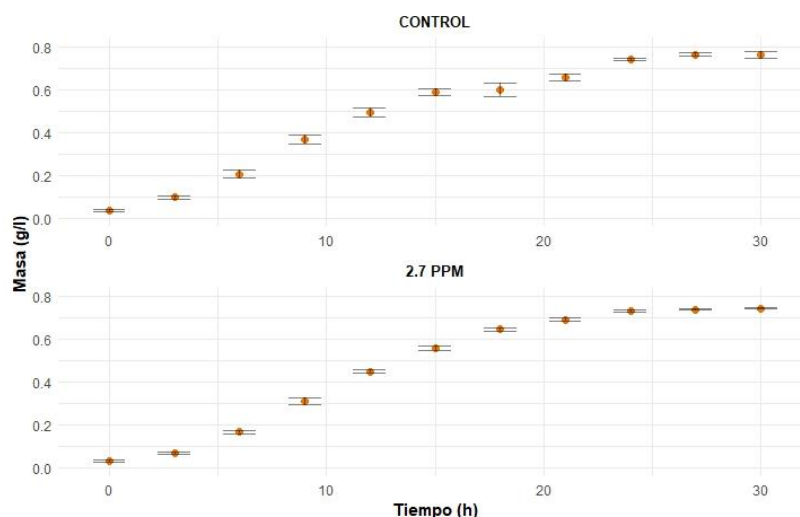
Parámetro	Control	Pre-adaptación	Post-adaptación
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.112 ± 0.011	0.004 ± 0.0002	0.104 ± 0.017
$pb \text{ (g L}^{-1} \text{ día}^{-1}\text{)}$	0.580 ± 0.012	0.017 ± 0.0052	0.570 ± 0.010

Nota. Valores promedio \pm DE.

Sin embargo, la presencia del Cd en el medio inhibió casi en su totalidad el crecimiento de las levaduras. Aun así, luego de exponer continuamente a las levaduras a concentraciones bajas de Cd se logró incrementar su tolerancia considerablemente (Figura 3) mediante adaptaciones sucesivas a este elemento, igualando el crecimiento de las levaduras en ausencia de Cd.

Figura 3

Cinética de crecimiento de S. cerevisiae post adaptación al Cd



Nota. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE.

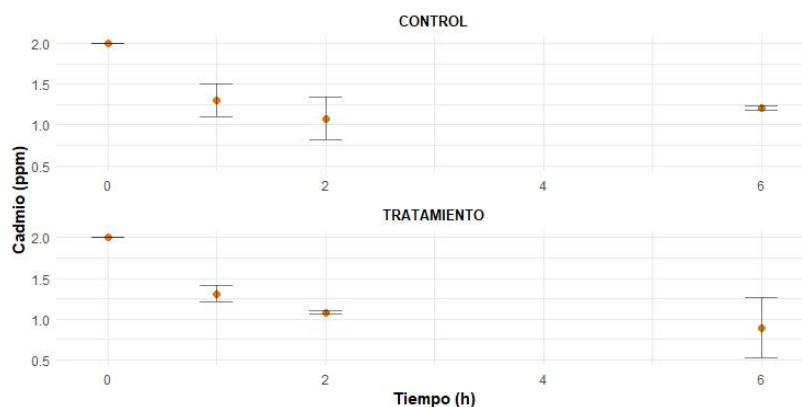
3.3 Porcentaje de remoción

La cepa de *S. cerevisiae* empleada mostró potencial para remover el Cd presente en el suelo, presumiblemente por medio de un proceso de adsorción. Los análisis de AAS

(espectroscopía de absorción atómica) evidenciaron una reducción de las concentraciones del metal pesado (Figura 4 y 5).

Figura 4

Cinética de remoción de Cd bajo una aireación de 6.5 L/min

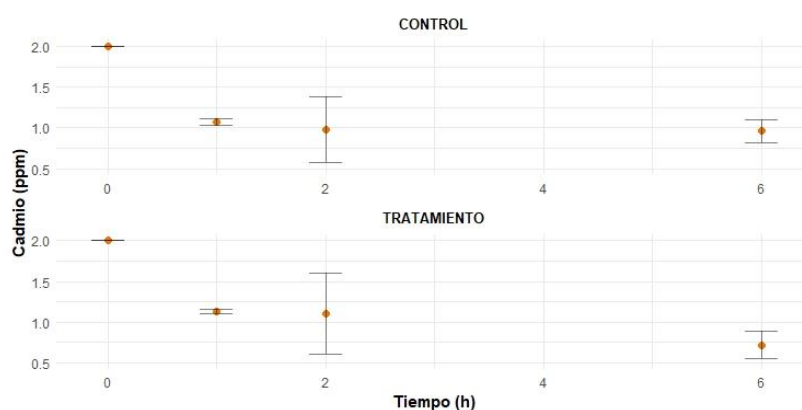


Nota. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE.

La remoción máxima se obtuvo a las 6 horas, tanto en los tratamientos con levaduras, como en los controles expuestos a ambos tratamientos de aireación. El mayor porcentaje de remoción correspondiente al 64% se obtuvo aplicando levaduras previamente adaptadas a Cd (Tabla 1) y un flujo de aire de 1 L/min.

Figura 5

Cinética de remoción de Cd bajo una aireación de 1 L/min



Nota. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE.

El tratamiento de levaduras con una aireación de 6.5 L/min mostró un 57% de remoción final, mientras que los controles (sin aplicar levaduras) de 6.5 L/min y 1 L/min generaron a remoción del 39.5% y 52% respectivamente.

Tabla 2

Porcentaje de remoción final en cada tratamiento

Aire (ml/min)	Tratamiento	Cd inicial (ppm)	Cd final (ppm)	% remoción
6500	Levaduras	2	0.86	57
6500	Control	2	1.21	39.5
1000	Levaduras	2	0.72	64
1000	Control	2	0.96	52

En todos los tratamientos se observó una tendencia negativa en la concentración de Cd. No obstante, el análisis estadístico no mostró ninguna diferencia entre los resultados obtenidos con el tratamiento de las levaduras y el control (p -valor = 0.4647) (Figura 6), ni entre ambos tratamientos de aireación (p -valor = 0.2112) (Figura 7).

3.4 Isotermas de adsorción

Las constantes obtenidas con los modelos de Langmuir y Freundlich se resumen en la Tabla 2. Ambas isotermas mostraron valores de R^2 similares, aunque el del modelo de Langmuir fue ligeramente mayor.

Tabla 3

Constantes de las respectivas isotermas en base a los resultados de adsorción de Cd en suelo por parte de *S. cerevisiae*

Langmuir				Freundlich		
<i>RL</i>	<i>R</i>	<i>qmax</i>	<i>R</i> ²	<i>n</i>	<i>Kf</i>	<i>R</i> ²
0.21	-2.80	0.001	0.97	1.31	0.001	0.96

Nota. Las isotermas se realizaron tomando en cuenta los promedios de dos réplicas realizadas.

Los valores de q_{max} y K_f calculados son similares y muy bajos, influenciados por la cantidad de Cd removido por las levaduras en todo el tiempo de evaluación. El modelo de Langmuir indica que la cantidad máxima de absorción del metal (q_{max}) es de 0.001 mg Cd/g biomasa, mientras que la constante afinidad entre el adsorbato y el absorbente (b) fue de -2.80 mg/L, mostrando una adsorción favorable $RL = 0.21$. Por otro lado, por el modelo de

Freundlich se obtuvo una capacidad de sorción (K_f) de 0.001 mg/L y una intensidad de sorción (n) de 1.31 mg/L.

Capítulo cuatro

Discusión

4.1 Pruebas de tolerancia

La cepa de levadura empleada mostró una tolerancia mucho menor a la reportada en bibliografía. Autores como Damodaran et al. (2011), Imam et al. (2016) y Massoud et al. (2020) han reportado que *S. cerevisiae* posee una tolerancia frente al Cd mucho mayor a la observada en este estudio, indicando que puede tolerar concentraciones de hasta 400 ppm. Los resultados mostrados por estos autores también han sido muy variables, obteniendo diferentes tolerancias máximas entre ellos. Esto indica que la tolerancia no está determinada sólo por la especie, sino que también influye la cepa y el tiempo a la que esta ha sido expuesta al contaminante en cuestión (tiempo de adaptación). Chen et al. (2021) exponen que la toxicidad del Cd se debe principalmente a la absorción intracelular por parte de las levaduras, y que la expresión del gen responsable de mediar este proceso tiende a reducirse con una exposición prolongada. De esta forma se reduce el impacto del Cd en las células de levaduras, les permiten desarrollarse de mejor manera y les confiere la capacidad de interactuar de forma más segura con este metal. Dicho esto, es muy probable que la baja tolerancia de la cepa empleada se deba principalmente al hecho de que no ha sido expuesta al Cd con anterioridad. Aun así, su capacidad de adaptación indica que tiene el potencial de ser empleada para remediar bajas concentraciones de Cd.

4.2 Porcentaje de remoción

La cantidad de Cd removido obtenido se aleja de los resultados evidenciados por autores como Imam et al. (2016) o Huang et al. (2020). En ambos casos se observaron porcentajes de remoción cercanos al 70% o mayores, en concentraciones más altas de Cd. Imam et al. (2016), por un lado, emplearon concentraciones mayores a 100 ppm, mientras que Huang et al. (2020) obtuvieron su mayor porcentaje de remoción en concentraciones de 20 ppm. En este caso, el porcentaje de remoción fue similar, pero bajo concentraciones de Cd mucho más bajas, por lo que la cantidad de Cd removido por las levaduras fue mínimo en comparación.

Una posible causa, además de su baja tolerancia, son las características ambientales a la que fue expuesta la levadura al ser inoculada en el suelo. Las propiedades del suelo pudieron no ser adecuadas para el desarrollo de la levadura y la consecuente toma del Cd por parte de estas, en especial el pH. Si bien el pH inicial del suelo presentaba características adecuadas para *S. cerevisiae*, el crecimiento de esta levadura tiende a acidificar el medio, esto se evidenció con cambios de pH en el medio acuoso a lo largo de las cinéticas de crecimiento. Ghorbani et al. (2008) observaron que los mayores porcentajes de remoción se daban en ambientes con un pH de 7.2 y tendía a disminuir con este.

No obstante, tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con la levadura y los controles (Figura 6). Es posible que los controles hayan presentado contaminación, ayudando a reducir el Cd, o que la cantidad de levadura empleada no haya sido suficiente para generar una remoción efectiva del metal. Massoud et al. (2019) indicaron que la masa empleada, juega un papel importante en la remoción del contaminante. También es posible que el proceso de lixiviado de las levaduras no haya sido eficiente, esto explicaría por qué no se redujo el Cd a pesar de haber sido adsorbido por las levaduras, ya que existe mucha evidencia sobre la capacidad de absorción de Cd por parte de *S. cerevisiae* (Ghorbani et al., 2008; Huang et al., 2020).

4.3 Isotermas de adsorción

Los modelos analizados en las isotermas ayudan a explicar el proceso de sorción llevado a cabo por las levaduras. De acuerdo con los valores obtenidos de R^2 de ambos modelos, el de Langmuir es el que mejor explica la dinámica de sorción. Este resultado se comparte con varios autores y permite explicar el proceso de sorción desde un proceso de adsorción en monocapa (Ghorbani et al., 2008; Massoud et al., 2019). El R^2 obtenido por el modelo de Freundlich también es bastante alto y explica una adsorción en varias capas, con un potencial de adsorción que se reduce exponencialmente según aumenta la adsorción (Khayyun y Mseer, 2019). Ghorbani et al. (2008), establecieron que la adsorción de Cd llevada a cabo por *S. cerevisiae* podría explicarse mejor empleando ambos modelos, con una adsorción inicial rápida en monocapa seguida de una acumulación intrapartícula más lenta.

Adicionalmente, ambos modelos mostraron afinidad hacia el Cd por parte de la levadura con un valor de $RL = 0.21$ con el modelo de Langmuir y un valor de $n = 1.31$ en el modelo de Freundlich, lo que indica que se está llevando a cabo una adsorción favorable.

Conclusiones

Saccharomyces cerevisiae mostró una rápida adaptación al Cd, lo que es favorable en procesos de adsorción. Los tratamientos con la levadura con flujos de aire a 6.5 L/min y 1 L/min removieron 57% y 64% del Cd presente en las muestras de suelo respectivamente. Ambos resultados son positivos y muestran la capacidad de esta levadura de ser empleada en procesos de remoción de Cd en suelos, siempre y cuando se las realice bajo las condiciones adecuadas, ya que las condiciones del entorno donde se lleva a cabo la sorción son factores determinantes para su crecimiento y éxito de remoción.

Recomendaciones

En esta ocasión no fue posible realizar varios análisis estadísticos por el número de datos. En este sentido es recomendable emplear más réplicas aumentando el número de tratamientos para poder obtener modelos y análisis estadísticos que expliquen de forma más precisa el fenómeno de sorción.

Dependiendo de la metodología a emplear (si se usa masa viva o no), es importante tomar en cuenta la tolerancia del microorganismo frente al contaminante, por lo que es recomendable una fase de adaptación del microorganismo a concentraciones superiores a las que se pretende remediar con el fin de aumentar su supervivencia y el porcentaje de remoción.

Los procesos de sorción por parte de los microorganismos a menudo están mediados por muchos factores tanto del microorganismo, del ambiente y de la metodología aplicada. Es importante detallar lo mejor posible la metodología usada para facilitar la replicabilidad y mejora de la misma, apuntando siempre a generar procesos aplicables a gran escala o *ex situ*.

Referencias

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., & Wassie, M. (2017). The role of microorganisms in bioremediation-A review. *Open Journal of Environmental Biology*, 2(1), 038-046.
- Abt, E., Fong Sam, J., Gray, P., & Robin, L. P. (2018). Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11(2), 92-102.
- Adagunodo, T. A., Sunmonu, L. A., & Emetere, M. E. (2018). Heavy metals' data in soils for agricultural activities. *Data in Brief*, 18, 1847–1855. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2018.04.115>
- Ali, S. S., Rajpoot, K., Gajjar, B., & Sachdeva, A. (2016). Comparative Study of Heavy Metal Bioremediation in Soil by *Bacillus Subtilis* and *Saccharomyces Cerevisiae*. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(47). <https://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i47/106911>
- Azzi, V., Kazpard, V., Lartiges, B., Kobeissi, A., Kanso, A., & El Samrani, A. G. (2017). Trace metals in phosphate fertilizers used in Eastern Mediterranean countries. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 45(1).
- Barraza, F., Schreck, E., Uzu, G., Lévêque, T., Zouiten, C., Boidot, M., & Maurice, L. (2021). Beyond cadmium accumulation: Distribution of other trace elements in soils and cacao beans in Ecuador. *Environmental Research*, 192, 110241.
- Bazán Tapia, R. (2017). Manual de procedimientos de los análisis de suelos y agua con fines de riego.
- Bigalke, M., Ulrich, A., Rehmus, A., & Keller, A. (2017). Accumulation of cadmium and uranium in arable soils in Switzerland. *Environmental pollution*, 221, 85-93.
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*, 533, 205-214.

- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., & Baligar, V. C. (2016). Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere*, *150*, 57-62.
- Chellaiah, E. R. (2018). Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Applied water science*, *8*(6), 1-10.
- Chen, M., Wang, L., Zheng, X., Cohen, M., & Li, X. (2021). Cross-Kingdom comparative transcriptomics reveals conserved genetic modules in response to cadmium stress. *Msystems*, *6*(6), e01189-21.
- Damodaran, D., Suresh, G., & Mohan, R. (2011). Biorremediation of soil by removing heavy metals using *Saccharomyces cerevisiae*. *2nd International Conference on Environmental Science and Technology*, *6*.
- De Rossi, A., Riguetto, C. V., Dettmer, A., Colla, L. M., & Piccin, J. S. (2020). Synthesis, characterization, and application of *Saccharomyces cerevisiae*/alginate composites beads for adsorption of heavy metals. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *8*(4), 104009.
- Dong, Q., Fang, J., Huang, F., & Cai, K. (2019). Silicon amendment reduces soil Cd availability and Cd uptake of two *Pennisetum* species. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(9), 1624.
- Ghorbani, F., Younesi, H., Ghasempouri, S. M., Zinatizadeh, A. A., Amini, M., & Daneshi, A. (2008). Application of response surface methodology for optimization of cadmium biosorption in an aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical engineering journal*, *145*(2), 267-275.
- Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., ... & Farooq, M. (2021). Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *211*, 111887.
- Hayat, M. T., Nauman, M., Nazir, N., Ali, S., & Bangash, N. (2019). Environmental hazards of cadmium: past, present, and future. In *Cadmium toxicity and tolerance in plants* (pp. 163-183). Academic Press.

- Huang, H., Jia, Q., Jing, W., Dahms, H. U., & Wang, L. (2020). Screening strains for microbial biosorption technology of cadmium. *Chemosphere*, 251, 126428. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.126428>
- Hussain, B., Ashraf, M. N., Abbas, A., Li, J., & Farooq, M. (2021). Cadmium stress in paddy fields: effects of soil conditions and remediation strategies. *Science of The Total Environment*, 754, 142188.
- ICCO, 2022. ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. Cocoa year 2021/22. Vol. XLVII, No.2 (2022) Recuperado de: [Statistics - International Cocoa Organization \(icco.org\)](https://www.icco.org/)
- Igiri, B. E., Okoduwa, S. I., Idoko, G. O., Akabuogu, E. P., Adeyi, A. O., & Ejiogu, I. K. (2018). Toxicity and bioremediation of heavy metals contaminated ecosystem from tannery wastewater: a review. *Journal of toxicology*, 2018.
- Imam, S. A., Rajpoot, I. K., Gajjar, B., & Sachdeva, A. (2016). Comparative study of heavy metal bioremediation in soil by *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian J. Sci. Technol*, 9(47), 1-7.
- Ismael, M. A., Elyamine, A. M., Moussa, M. G., Cai, M., Zhao, X., & Hu, C. (2019). Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. *Metallomics*, 11(2), 255-277.
- Ismael, M. A., Elyamine, A. M., Moussa, M. G., Cai, M., Zhao, X., & Hu, C. (2019). Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. *Metallomics*, 11(2), 255-277.
- Suhani, I., Sahab, S., Srivastava, V., & Singh, R. P. (2021). Impact of cadmium pollution on food safety and human health. *Current Opinion in Toxicology*, 27, 1-7.
- Jin, Y., Luan, Y., Ning, Y., & Wang, L. (2018). Effects and mechanisms of microbial remediation of heavy metals in soil: a critical review. *Applied Sciences*, 8(8), 1336.
- Kapahi, M., & Sachdeva, S. (2019). Bioremediation options for heavy metal pollution. *Journal of Health and Pollution*, 9(24). <https://doi.org/10.5696/2156-9614-9.24.191203/445556>
- Khan, A., Khan, S., Khan, M. A., Qamar, Z., & Waqas, M. (2015). The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and

- associated health risk: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 2015 22:18, 22(18), 13772–13799. <https://doi.org/10.1007/S11356-015-4881-0>
- Khan, I., Aftab, M., Shakir, S., Ali, M., Qayyum, S., Rehman, M. U., ... & Touseef, I. (2019). Mycoremediation of heavy metal (Cd and Cr)–polluted soil through indigenous metallotolerant fungal isolates. *Environmental monitoring and assessment*, 191(9), 1-11.
- Khan, M. A., Khan, S., Khan, A., & Alam, M. (2017). Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. In *Science of the Total Environment* (Vols. 601–602, pp. 1591–1605). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.030>
- Khayyun, T. S., & Mseer, A. H. (2019). Comparison of the experimental results with the Langmuir and Freundlich models for copper removal on limestone adsorbent. *Applied Water Science*, 9(8), 1-8.
- Kubier, A., Wilkin, R. T., & Pichler, T. (2019). Cadmium in soils and groundwater: a review. *Applied Geochemistry*, 108, 104388.
- Kumar, M., Seth, A., Singh, A. K., Rajput, M. S., & Sikandar, M. (2021). Remediation strategies for heavy metals contaminated ecosystem: A review. *Environmental and Sustainability Indicators*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.indic.2021.100155>
- Masindi, V., & Muedi, K. L. (2018). Environmental Contamination by Heavy Metals. In *Heavy Metals*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.76082>
- Massoud, R., Hadiani, M. R., Hamzehlou, P., & Khosravi-Darani, K. (2019). Bioremediation of heavy metals in food industry: Application of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Electronic Journal of Biotechnology* (Vol. 37, pp. 56–60). Pontificia Universidad Catolica de Valparaiso. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.003>
- Massoud, R., Khosravi-Darani, K., Sharifan, A., Asadi, G. H., & Younesi, H. (2020). The biosorption capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for cadmium in milk. *Dairy*, 1(2), 169-176.

- McLaughlin, M. J., Smolders, E., Zhao, F. J., Grant, C., & Montalvo, D. (2021). Managing cadmium in agricultural systems. *Advances in Agronomy*, 166, 1-129.
- Mondal, S. C., Sarma, B., Farooq, M., Nath, D. J., & Gogoi, N. (2020). Cadmium bioavailability in acidic soils under bean cultivation: role of soil additives. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17(1), 153-160.
- Oyewole, O. A., Zobeashia, S. S. L. T., Oladoja, E. O., Raji, R. O., Odiniya, E. E., & Musa, A. M. (2019). Biosorption of heavy metal polluted soil using bacteria and fungi isolated from soil. *SN Applied Sciences*, 1(8). <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0879-4>
- Penedo Medina, M., Manals Cutiño, E. M., Vendrell Calzadilla, F., & Salas Tort, D. (2015). Adsorción de níquel y cobalto sobre carbón activado de cascarón de coco. *Tecnología Química*, 35(1), 110-124.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1.
- Priya, A. K., Gnanasekaran, L., Dutta, K., Rajendran, S., Balakrishnan, D., & Soto-Moscoco, M. (2022). Biosorption of heavy metals by microorganisms: Evaluation of different underlying mechanisms. *Chemosphere*, 307, 135957.
- Qayyum, S., Khan, I., Meng, K., Zhao, Y., & Peng, C. (2020) A review on remediation technologies for dense metals polluted soil. *Central Asian Journal of Environmental Science and Technology Innovation*, 1, 21–29. <https://doi.org/10.22034/CAJESTI.2020.01.03>
- Raj, D., & Maiti, S. K. (2019). Sources, toxicity, and remediation of mercury: an essence review. *Environmental monitoring and assessment*, 191(9), 1-22.
- Rajendran, S., Priya, T. A. K., Khoo, K. S., Hoang, T. K. A., Ng, H. S., Munawaroh, H. S. H., Karaman, C., Orooji, Y., & Show, P. L. (2022). A critical review on various remediation approaches for heavy metal contaminants removal from contaminated soils. *Chemosphere*, 287, 132369. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.132369>

- Rofner, N. F. (2021). Review on maximum limits of cadmium in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *La Granja:Revista de Ciencias de La Vida*, 34(2), 117–130. <https://doi.org/10.17163/LGR.N34.2021.08>
- Romero-Estévez, D., Yáñez-Jácome, G. S., Simbaña-Farinango, K., & Navarrete, H. (2019). Content and the relationship between cadmium, nickel, and lead concentrations in Ecuadorian cocoa beans from nine provinces. *Food control*, 106, 106750.
- Salazar, O. V., Ramos-Martín, J., & Lomas, P. L. (2018). Livelihood sustainability assessment of coffee and cocoa producers in the Amazon region of Ecuador using household types. *Journal of Rural Studies*, 62, 1-9.
- Samaniego, I., Espín, S., Quiroz, J., Ortiz, B., Carrillo, W., García-Viguera, C., & Mena, P. (2020). Effect of the growing area on the methylxanthines and flavan-3-ols content in cocoa beans from Ecuador. *Journal of Food Composition and Analysis*, 88, 103448.
- Tang, J., Zhang, J., Ren, L., Zhou, Y., Gao, J., Luo, L., Yang, Y., Peng, Q., Huang, H., & Chen, A. (2019). Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: A review on heavy metal pollution. In *Journal of Environmental Management* (Vol. 242, pp. 121–130). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.061>
- Vasudevan, P., Padmavathy, V., & Dhingra, S. C. (2003). Kinetics of biosorption of cadmium on Baker's yeast. *Bioresource Technology*, 89(3), 281–287. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00067-1)
- Wang, P., Chen, H., Kopittke, P. M., & Zhao, F. J. (2019). Cadmium contamination in agricultural soils of China and the impact on food safety. *Environmental pollution*, 249, 1038-1048.
- Yin, K., Wang, Q., Lv, M., & Chen, L. (2019). Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal*, 360, 1553-1563.
- Yu, Y., & Flury, M. (2021). How to take representative samples to quantify microplastic particles in soil?. *Science of The Total Environment*, 784, 147166.
- Zhang, H., & Reynolds, M. (2019). Cadmium exposure in living organisms: A short review. *Science of the Total Environment*, 678, 761-767.

Apéndice

Apéndice A. Gráficos de las medias del Cd removido entre los tratamientos

Figura A.1

Gráfico de cajas de los valores de remoción de Cd obtenidos con las levaduras y el control

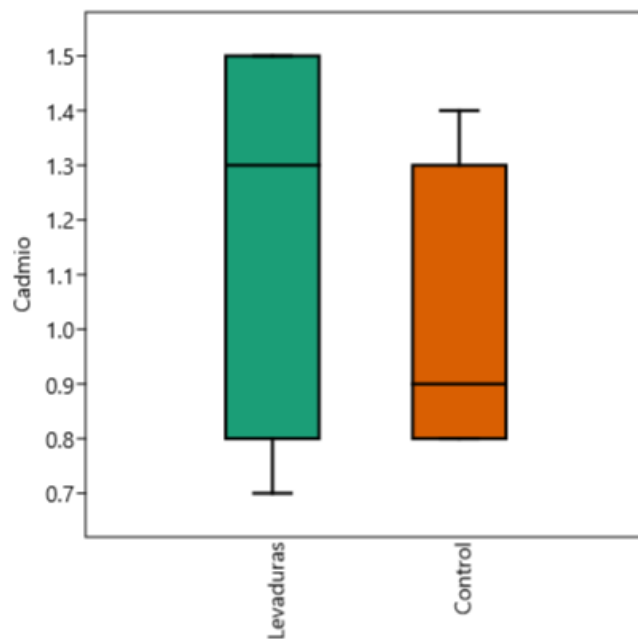


Figura A.2

Gráfico de cajas de los valores de remoción de Cd obtenidos con los diferentes niveles de aireación

