



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**Eficiencia de los microorganismos nativos frente a la
Pseudomonasputida en la reducción del Cr⁺⁶ de aguas residuales
de una curtiembre**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
Ingeniero Ambiental**

AUTOR:

Luna Grandez, Jaime (ORCID: 0000-0003-1759-1559)

ASESOR:

Dr. Valdiviezo Gonzales, Lorgio (ORCID: 0000-0002-8200-4640)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Tratamiento y Gestión De Residuos

LIMA – PERÚ

2020

Dedicatoria

A mi familia por su apoyo constante e incondicional en cada una de las decisiones tomadas.

Agradecimiento

A mi familia, compañeros y docentes que estuvieron presentes en cada una de las etapas de mi desarrollo pre profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	Introducción.....	8
II.	Marco teórico.....	11
III.	Método.....	16
3.1.	Tipo y diseño de la investigación.....	16
3.2.	Variables y operacionalización.....	20
3.3.	Población, muestra y muestreo.....	21
3.4.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	21
3.5.	Procedimiento.....	22
3.6.	Métodos de análisis de datos.....	23
3.7.	Aspectos éticos.....	23
I.V.	Resultados.....	24
V.	Discusiones.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N1.	Matriz de operacionalización de variables.....	20
Tabla N°2.	Porcentaje promedio de la reducción de Cr ⁺⁶ por bacteria.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Fase exploratoria I.....	18
Figura 2.	Fase exploratoria II.	18
Figura 3.	Fase experimental y Fase concluyente.....	19
Figura 4.	Reducción porcentual de Cr ⁺⁶ por bacterias y sus combinaciones.....	24
Figura 5.	Prueba de ANOVA de reducción de Cr ⁺⁶ por bacterias.....	26
Figura 6.	Prueba de Tukey para la comparación de parejas de medias de bacterias.....	26
Figura 7.	Prueba de Kruskal – Wallis para la reducción de Cr ⁺⁶ en el tiempo.....	27

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Identificación taxonómica molecular de la <i>Kocuria rosea</i>	40
Anexo 2: Identificación taxonómica molecular de la <i>Pseudomonas putida</i>	41
Anexo 3: Identificación taxonómica molecular del <i>Planomicrobium okeanokoite</i> ..	42
Anexo 4: Identificación taxonómica molecular del <i>Micrococcus luteus</i>	43
Anexo 5: Reducción de Cr ⁺⁶ por la <i>Pseudomonas putida</i>	44
Anexo 6: Reducción de Cr ⁺⁶ por la <i>Kocuria rosea</i>	45
Anexo 7: Reducción de Cr ⁺⁶ por la <i>Planomicrobium okeanokoites</i>	46
Anexo 8: Reducción de Cr ⁺⁶ por la <i>Micrococcus luteus</i>	47
Anexo 9: Reducción de Cr ⁺⁶ por <i>Kocuria rosea</i> y <i>Planomicrobium okeanokoites</i> .	48
Anexo 10: Reducción de Cr ⁺⁶ por <i>Planomicrobium okeanokoites</i> y <i>Micrococcus luteus</i>	49
Anexo 11: Reducción de Cr ⁺⁶ por <i>Kocuria rosea</i> y <i>Micrococcus luteus</i>	50
Anexo 12: Reducción de Cr ⁺⁶ por <i>Kocuria rosea</i> , <i>planomicrobium okeanokoites</i> y <i>Micrococcus luteus</i>	51
Anexo 13: Tablas con valores de absorbancia y curva de calibración.....	52
Anexo 14: Análisis estadísticos para el objetivo general y específico 1	53
Anexo 15: Análisis estadísticos para el objetivo específico 2.....	56

RESUMEN

En la presente investigación se determinó la eficiencia que los 3 microorganismos nativos encontrados tienen para reducir el Cr^{+6} frente a la *Pseudomonas putida*, la cual ya ha sido estudiada en otras investigaciones como una especie que es capaz de reducir el Cr^{+6} . Para ellos se realizó el aislamiento de bacterias nativas de efluentes de una curtiembre, posteriormente se realizó su purificación, acondicionamiento e identificación de las bacterias obtenidas. Las bacterias evaluadas fueron: *Kocuria rosea*, *Planomicrobium okeanoikoites* y *Micrococcus luteus*. Se realizó el aislamiento de la *Pseudomonas putida* así como su purificación. Se realizaron 3 repeticiones en 5 tiempos para cada una de las bacterias nativas, así como de sus respectivas combinaciones para determinar la cantidad de Cr^{+6} que se reduce. Mediante el estadístico de ANOVA se analizaron los resultados obtenidos, teniendo como conclusiones que la *Kocuria rosea* es el microorganismo que más redujo Cr^{+6} llegando a valores máximos de 21.16% en comparación de la *Pseudomonas putida* que redujo 10.64% y las combinaciones de las bacterias, cuyos resultados no fueron significativos. Finalmente, mediante el estadístico de Kruskal-Wallis se evaluó la influencia del tiempo en la degradación del Cr^{+6} por día, dando como resultado la inexistencia de diferencias significativas entre la degradación de un día y otro; llegando a la conclusión de que el tiempo no influye en la reducción de Cr^{+6} .

Palabras claves: *Pseudomonas putida*, *Kocuria rosea*, *Planomicrobium okeanoikoites*, *Micrococcus luteus*, Cr^{+6} , degradación, biorremediación.

ABSTRACT

This research, determined the efficiency that three native microorganisms have to reduce Cr^{+6} against *Pseudomonas putida*, which has been studied in other research as a species that is capable of reducing Cr^{+6} . For them, isolation of native bacteria from the effluents of a tannery was carried out, subsequently purification, conditioning and identification of the bacteria evaluated were carried out. The bacteria obtained were: *Kocuria rosea*, *Planomicrobium okeanoikoites* and *Micrococcus luteus*. Isolation of *Pseudomonas putida* as well as purification were also performed. 3 repetitions were carried out in 5 times for each of the native bacteria, as well as their respective combinations to determine the amount of Cr^{+6} that is reduced. By means of the statistical analysis of ANOVA, the results obtained will be analyzed, taking into account the conclusions of *Kocuria rosea* is the microorganism that reduced Cr^{+6} the most, reducing it to 21.16% in the comparison of *Pseudomonas putida*, which reduced 10.64% and combinations of bacteria, the results of which were not necessary. Finally, using the Kruskal-Wallis statistic, the influence of time on Cr^{+6} degradation per day was evaluated, resulting in the absence of significant differences between the degradation from one day to another; concluding that time does not influence the reduction of Cr^{+6} .

Keywords: *Pseudomonas putida*, *Kocuria rosea*, *Planomicrobium okeanoikoites*, *Micrococcus luteus*, Cr^{+6} , degradation, biorremediation.

I. INTRODUCCIÓN

El agua es considerada como uno de los recursos más importantes para la vida, pero solo el 3% del total de agua sobre la tierra es agua fresca y aproximadamente el 30 % de esta es accesible (Kalhor *et al*, 2019, p. 105). Además, este recurso se usa en las diferentes actividades que permiten el desarrollo de los países, tales como la agricultura y la producción; siendo uno de las actividades que hace uso del agua, el curtido de pieles.

La producción de cuero, cuyo proceso es el curtido, ha sido considerado como uno de los más importantes procesos industriales desde épocas antiguas. Por siglos, el cuero fue uno de los pocos materiales para la producción de alta durabilidad de prendas y calzados. Hoy en día el cuero sigue siendo el material principal para la producción de prendas y calzados debido a sus propiedades únicas (sawalha *et al*, 2020, p.679).

La industria del curtido a lo largo de todo el mundo genera aproximadamente 40 millones de residuos contaminados con cromo cada año, en consecuencia, con una inadecuada norma de regulación, es importante tener conocimiento acerca de las aguas residuales para preservar la calidad en todos los cuerpos de aguas a lo largo de todo el mundo. El cromo es el elemento más tóxico presente en los residuos de curtiembres (Saranraj y Sujitha, 2019, p. 305).

Los daños que puede producir el Cr^{+6} pueden ser a nivel respiratorio, reproductivo, de desarrollo, hematológico, gastrointestinal, inmunológico, e irritación (dérmica y ocular), además el cromo puede generar efectos inmunológicos en forma de contacto alérgico, las personas que ingieran concentraciones altas de cromo o Cr^{+3} tendrán severos problemas respiratorios, hepáticos, neuronales, cardiovasculares, mientras que algunas personas que ingieran altas concentraciones de Cr^{+6} fallecerían (Wise, Shi y Zhang, 2019, p. 8).

Hasta el 2013, en el Perú existían 92 empresas de curtido de pieles, de las cuales 14 se encontraban en Lima, así mismo, en el tradicional proceso de curtido que se lleva a cabo en el país, se verifica que la piel consume en promedio entre el 60% y 80% del cromo empleado, el otro 20% a 40% de cromo es expulsado a las alcantarillas como agua residual, con alta carga de dicho metal (Córdova, 2014, p.

183). Adicional a ello, solo el 50% del que se produce a nivel nacional, provienen de las empresas formales; en distintas regiones del país, existen empresas informales que descargan sus efluentes sin un previo tratamiento, elevando de esa manera la contaminación de los ríos (Rey de Castro, 2013, p. 15).

La alta carga de elementos contaminantes que descargan las curtiembres son peligrosas, causan serios problemas para la calidad del agua, dañan la ecología y amenazan a las personas, especialmente en los centros urbanos en desarrollo donde se operan las empresas de curtiembres (Whitehead et al, 2019, p. 2).

El cromo como lixiviado mixto es generalmente tratado en procesos físico-químicos, mediante la aplicación de agentes reductores químicos, para reducir Cr^{+6} a Cr^{+3} , este proceso deja como remanente lodos tóxicos químicos, que son aún más costosos tratarlos; alternativamente se podría emplear procesos biológicos más pasivos, los cuales facilitan la reducción del cromo en el ambiente (Bansal, Coetzee, chirwa, 2019, p. 281).

A pesar que existen diversos métodos de reducción de Cr^{+6} , tales como: Precipitación química, ósmosis inversa, intercambio iónico, filtración, activación de carbono, etc. estos resultan ser de alto costo, poco efectivos y generan lodos con metales, por lo que es necesario el empleo de métodos de ecoamigables, de bajos costos y eficientes, para la remoción de Cr^{+6} y de esa manera asegurar el cuidado del ambiente y la salud humana (Bharagava y Mishra, 2018, p. 103).

En estudios que se han realizado de sistemas bacterianos, fúngicos e incluso algas, han encontrado que estos resultan ser agentes de absorción de metales, es por ello que dichos microorganismos juegan un papel muy importante en la biorremediación de suelos y cuerpos de agua contaminados con metales pesados, y pueden llegar a ser más económicos y favorables que los tratamientos físicos y químicos tradicionales (Dey *et al*, 2016, p. 680).

Por tal sentido, con la presente investigación, se busca encontrar una alternativa ecoamigable de tratamiento para los efluentes con carga de cromo del tratamiento de pieles, empleando microorganismos nativos; los resultados, brindaran un aporte a los conocimientos básicos que podrían ser usados en la creación de proyectos y con ello, también, busca que las empresas de curtiembres posean una visión de

desarrollo sostenible de manera que cumplan con la normativa y leyes ambientales vigentes.

En función de los problemas que acontecen en la realidad nacional, se realizó la formulación de los problemas de investigación, siendo el problema general: ¿Qué microorganismos nativos frente a la *Pseudomonas putida* resultan ser más eficientes para reducir el Cr^{+6} de las aguas residuales de una curtiembre? Y los problemas específicos los siguientes: 1. ¿Cuál es la combinación de microorganismos nativos que resulta más eficiente frente a la *Pseudomonas putida* en la reducción del contenido de Cr^{+6} de las aguas residuales de una curtiembre? 2. ¿Cuál es la influencia que el tiempo ejerce sobre la reducción de Cr^{+6} de aguas residuales de una curtiembre por microorganismos nativos frente a la *Pseudomonas putida*?

Así mismo el objetivo general es: Determinar cuáles son los microorganismos nativos frente a la *Pseudomonas putida* que resultan ser más eficientes en la reducción de Cr^{+6} de las aguas residuales de una curtiembre. Y los objetivos específicos son: 1. Determinar la combinación de microorganismos nativos más eficiente frente a la *Pseudomonas putida* en la reducción del contenido de Cr^{+6} de las aguas residuales de una curtiembre. 2. Evaluar la influencia del tiempo en la reducción de Cr^{+6} de aguas residuales de una curtiembre por microorganismos nativos frente a la *Pseudomonas putida*.

Y finalmente se realizó el planteamiento de las siguientes hipótesis, siendo la general: Los microorganismos nativos patógenos frente a la *Pseudomonas putida* son más eficientes para la reducción del contenido de Cr^{+6} de las aguas residuales de una curtiembre. Y las específicas: 1. La combinación de 3 microorganismos nativos es más eficiente frente a la *Pseudomonas putida* en la reducción del contenido de Cr^{+6} de las aguas residuales de una curtiembre. 2. El tiempo influye en la reducción de Cr^{+6} por microorganismos nativos frente a la *Pseudomonas putida*.

II. MARCO TEÓRICO

Es preciso tener en cuenta ciertos conceptos básicos que permiten entender el desarrollo de la presente investigación, así mismo se puede verificar que:

El cromo es un metal pesado cuyos estados de oxidación más estables en los que se puede encontrar al cromo son: el hexavalente y el trivalente; siendo el Cr^{+3} químicamente más estable. (Palazón *et al*, 2015, p. 53).

Por otro lado, el cromo hexavalente, es una de las formas más tóxicas del cromo que se pueda encontrar, estas pueden estar presentes como cromatos y dicromatos siendo solubles en un alto rango de pH y fáciles de transportar en el suelo y el agua. Estos iones son extremadamente tóxicos y mutagénicos cuando son consumidos en cantidades considerables (Da Rocha *et al*, 2019, p. 2).

Los efectos que el cromo hexavalente pueden generar en la salud de las personas son muchas, entre ellos: erupciones cutáneas, irritación y sangrado de la nariz, inflamación de los ojos, problemas estomacales como úlceras, dificultad respiratoria y síntomas de asma, disminución del sistema inmune, perjuicio del hígado y los riñones, cáncer a los pulmones y hasta el fallecimiento de las personas (Molina, Aguilar y Cordovez, 2010, p. 83).

En la actualidad existen diversas técnicas de remediación para la reducir la cantidad de cromo hexavalente que se encuentran en suelos y cuerpos de aguas, técnicas conocidas como remediación, tales como:

La precipitación de cromo, el cual por lo general emplea hidróxidos, sulfuros, carbonatos, y fosfatos, es uno de los métodos más tradicionales que se emplea para la reducción de cromo, sin embargo, esta genera lodos contaminantes con los residuos de los químicos empleados (Mohan, 2011, p.320).

La remediación por carbón activado, es otro de los métodos empleados para la reducción de cromo hexavalente, para la obtención de carbono se emplea cáscaras de coco, carbón vegetal, melocotón, entre otros. Si bien es cierto que es un método que es efectivo, debido a las grandes cantidades que se requieren para su uso, resulta ser de alto costo (Mohan y Pittman, 2006, p. 765).

Otro de los métodos empleados es la electrodiálisis, cuyo proceso de separación, consiste en la migración de iones en solución por acción de una fuerza electrostática generada por un potencial eléctrico entre dos electrodos; es una técnica que capta los metales de los efluentes, realizando así un reciclaje de elementos en el proceso sin un cambio físico o químico de los componentes. Sin embargo, la desventaja con este método es la gran cantidad de agua que se emplea para su eficiencia (Silveira *et al*, 2019, p. 2).

Así mismo, un método comúnmente empleado es la osmosis inversa, cuyo proceso se da a través de la permeación de una membrana que permite separar mediante difusión elementos muy pequeños (0.0001 mm), lo que le da una amplia gama de versatilidad a la hora de tratar aguas contaminadas con elementos metálicos (Caviedes *et al*, 2015, p. 75)

Por otro lado, el intercambio iónico es el proceso en el cual se usa una matriz sólida a donde es transferida los iones en solución y libera otros iones, pero de igual carga, este proceso es físico por lo que los iones intercambiados no se modifican químicamente. La ventaja de este método de remediación es la recuperación del valor del metal, menos volumen de lodos producidos y las condiciones de descargas estrictas (Zewail y Yousef, 2015, p. 84)

Sin embargo, uno de los métodos de remediación de aguas contaminadas que viene a ser sostenible es la Biorremediación, el cual es una herramienta que permite el control y manejo de contaminantes con la ayuda de microorganismos o especies biológicas. Posee una variedad de estrategias y métodos que actualmente están ganando posicionamiento tanto científico como público debido a su eficiencia y rentabilidad (Ramírez-García, R, 2018, p. 517).

En la actualidad, la tecnología de biorremediación basada en microorganismos ha llamado la atención a los científicos, porque sus ventajas incluyen alta eficiencia, bajo costo y ambientalmente amigable, especialmente en metales de bajas concentraciones. Actualmente algunos microorganismos pueden transformar los iones metálicos tóxicos de su forma activa a la forma inactiva, sin embargo, la relación interna entre la resistencia a los iones de metales pesados y su capacidad

de remediación no es aún clara. Dentro de estos microorganismos, los más empleados son las bacterias, los hongos y las algas (Kun *et al*, 2019, p. 1554).

En el campo de las bacterias se encuentran las pseudomonas, estos bacilos son de tipo Gram negativa, y se encuentran en la rama de las proteobacterias, entre sus principales características se encuentra su capacidad de adaptarse a distintos medios, así como su versatilidad metabólica. Estas se pueden encontrar en alimentos, suelos, agua y también asociados a plantas y animales. Desde la perspectiva ambiental son parte del ciclo de ciertos elementos traza y también como potenciales reductores de contaminantes que son generados por el hombre (Fernández, 2012, p. 3).

Además, algunas especies son bastante estudiadas como la *Pseudomona putida* por su capacidad de degradar compuestos tóxicos; esta información registrada en su genoma ha sido bastante estudiada y se ha demostrado que pueden tener mucho potencial biológico. Una de las ventajas para el manejo de la bacteria es que no es patógena, por ello se ha reportado como biosegura. Al tener la capacidad de colonizar las rizóferas y por su alta resistencia que le permite tolerar tóxicos orgánicos, sirven para poder realizar rizoremediación de suelos contaminados con sustancias que son tóxicas (Molina et al, 2017, p. 81).

Una de las enzimas más estudiadas de la *Pseudomona putida* es la flavoenzima soluble, la cual enlaza al Flavín MonoNucleótidos y cataliza la reducción de Cr^{+6} a Cr^{+3} dicha enzima es la Cr^{+6} reductasa, una proteína ChrR de la bacteria Gram negativa. Dicha enzima se encuentra en el periplasma celular, esta ubicación la hace estratégica para su uso en temas de biorremediación (RAMÍREZ et al, 2009, p. 75).

Existen diversos trabajos de investigación que sirven como base para de distintas investigaciones, así, tenemos las siguientes investigaciones:

En una investigación cuyo objetivo fue detectar bacterias que sean capaces de resistir y reducir el cromato, se aisló una bacteria nativa del agua de curtiembre, la cual fue identificada como *Staphylococcus sciuri*, se pudo verificar que después de 2, 4, 6 y 8 días pudo reducir 42, 73, 85 y 31 mM/g respectivamente. Llegando a la

conclusión de que en 6 días dicha bacteria fue capaz de eliminar alrededor del 93% de Cr^{+6} (Elahi y Rehman, p. 1005).

Sanjay *et al*, en la investigación que realizaron, cuyo objetivo fue aislar e identificar bacterias reductoras de Cr^{+6} de efluentes de curtiembres; logró aislar dos cepas de bacterias y posteriormente fueron identificadas como *Klebsiella pneumoniae* Y *Mangrovibacter yixingensis*, las cuales tenían una alta tolerancia al cromo. Dichas bacterias tenían una alta capacidad reductora de Cr^{+6} de hasta 80 mg/l y 100 mg/l respectivamente. Llegando a la conclusión de que dichas bacterias tienen un potencial significativo para reducir el cromo hexavalente tóxico (2020, p. 265).

En otro estudio, cuyo objetivo fue evaluar la reducción de Cr^{+6} por acción de las células bacterianas de las aguas residuales industriales; se aisló bacterias tolerantes al Cr^{+6} y se realizó la respectiva identificación, llegando a concluir que a pH 7 se logró reducir 84% de Cr^{+6} y a temperatura 35° C se redujo 100ug/ml de Cr^{+6} en residuos de aguas residuales (Wani *et al*, 2019, p. 38).

Además el trabajo realizado por Yaashikaa, Senthil y Saravanan tuvo un objetivo enfocado en el aislamiento y la identificación de bacterias resistentes al cromo que tienen ventajas potenciales en la degradación de cromo de aguas residuales industriales. Para ello aislaron e identificaron mediante preveas de amplificación de PCR, llegando a identificar al *Pannonibacter phragmitetus* el cual fue sometido a altas concentraciones de cromo hexavalente, llegando a verificarse que puede tolerar hasta 2200 mg/L de dicho ion. Llegaron a concluir que dicho microorganismo llegó a reducir hasta el 76% de Cr^{+6} presente en la muestra de agua contaminada (Yaashikaa, Senthil y Saravanan, 2019, p. 640).

Así mismo en la investigación de Zheng, cuyo objetivo fue aislar una cepa de bacteria que sea capaz de reducir Cr^{+6} de los suelos contaminados de Bayin; se aisló una cepa de bacteria y se identificó mediante la prueba de PCR que era el *Bacillus subtilis*, sometiéndolo a pruebas con K_2CrO_4 durante 48 h. Se concluyó que dicho microorganismo fue capaz de reducir 41.7 uM/h Cr^{+6} (2015, p. 90).

Otra investigación la cual tenía por objetivo cultivar, aislar y seleccionar bacterias reductoras de Cr^{+6} . Para ello, se hizo un análisis prospectivo de bacterias

resistentes a altos niveles de Cr^{+6} , tomando muestras de sedimentos con alta carga de cromo para la selección de bacterias, y luego seleccionaron aquellas bacterias capaces de reducir el Cr^{+6} del agua para explorar su potencial biotecnológico en la depuración de aguas residuales que contengan cromo. Finalmente, concluyeron que tres de las cepas aisladas fueron capaces de reducir cromo, siendo el máximo de reducción de 33.17% en 12 días (Islas y Bojórquez, 2011, p. 231).

El estudio genotóxico de microorganismos para reducir cromo de aguas de curtiembres, tuvo por objetivo aislar bacterias reductoras de Cr^{+6} y estudiar el potencial de biorremediación que poseen para el tratamiento de efluentes de curtiembres. Para ello realizaron una colección de muestras de efluentes de curtiembres, del cual aislaron e identificaron bacterias. La bacteria identificada fue el *Bacillus cereus* que posteriormente fue sembrada e inoculada en frascos que contenían 100 ml del efluente. Concluyendo que dicha cepa de bacteria pudo reducir hasta un 92% del Cr^{+6} que había en el efluente inicialmente (Kumari *et al*, 2016, p. 204).

Su *et al*, tuvieron como uno de sus objetivos, en su estudio, investigar las características de reducción de Cr^{+6} por microorganismos nativos. Los microorganismos nativos aislados fueron incubados en un biorreactor bajo condiciones aeróbicas y los resultados fueron analizados mediante el método estadístico análisis de varianza usando el programa SPSS. Se concluyó que los microorganismos nativos juegan un rol muy importante en la reducción de Cr^{+6} de los suelos contaminados, la concentración de cromo hexavalente fue redujo de 1521.9 a 199.2 mg/kg en 66 horas, un aproximado de 87% (2019, 1304)

En la investigación de Qu *et al*, se plateó como uno de los objetivos demostrar que la remoción de Cr^{+6} mediante el uso de una bacteria magnetotáctica debería ser considerada como una solución potencial para la contaminación de aguas con efluentes con alto contenido de cromo hexavalente. En dicha investigación sembraron bacterias magnetotácticas en microplástico para posteriormente realizar las mediciones de la reducción de cromo hexavalente en muestras de agua. Concluyeron que bajo condiciones óptimas de pH las bacterias mangnetotácticas llegaron a reducir hasta el 80% de Cr^{+6} (2014, p. 10).

El estudio de investigación de Kumaresan *et al*, tuvo por objetivo reducir Cr+6 a Cr+3 con la ayuda de dos bacterias nativas de aguas residuales de curtiembres. En la investigación, el *Bacillus cohnii* y *Bacillus licheniformis* fueron aisladas de una muestra de aguas residuales de curtiembre, y posteriormente fue evaluada su capacidad reductora de cromo mediante el software Response Surface Methodology (RSM). Concluyeron que el *Bacillus cohnii* y *Bacillus licheniformis* redujeron en 94% y 95% respectivamente en 25 horas (2020, p.1969).

III. MÉTODO

3.1. Tipo y diseño de la investigación

La investigación aplicada es aquella que utiliza conocimientos previos y que después de realizar la práctica en base a la investigación, se adquieren nuevos conocimientos, además, el empleo de los conocimientos adquiridos está orientado a solucionar problemas cotidianos (Vargas, 2009, 159). En el presente trabajo, a través de los conocimientos previos, la investigación, la experimentación y los conocimientos obtenidos, se busca solucionar un problema presente el cual es contaminación de los cuerpos de agua por efluentes de curtiembres con carga de Cr⁺⁶).

Así mismo, en una investigación de diseño experimental, la variable independiente es manipulada por el investigador, por lo que se puede evidenciar la causa-efecto teniendo mayor control de la misma (Tam, Vera y Oliveros, 2008, p. 149). Es por ello, que al manipular las variables en el presente trabajo de investigación y tener grupos control y grupos experimentales, se identifica como una investigación de diseño experimental.

El trabajo se dividió en 3 fases (Fase exploratoria, fase experimental y fase concluyente). La fase exploratoria se dividió en dos partes, en la en la *figura 1* se presenta la Fase I en donde se verifica los procesos del curtido de pieles, los cuales son el pre-remojo y remojo; el pelambre; descarnado; divididora; desencalado, desangre y purga; piquelado; curtido con cromo; escurrido, primera rebajada y

segunda rebajada (en cada uno de los procesos se puede verificar la materia que entra y la materia que sale).

En la *figura 2* se observa la segunda parte de la fase exploratoria se realizó la recolección de datos, los cuales incluyeron la identificación de la realidad problemática, en donde se indica de forma general el problema por el cual se está realizando la investigación, planteamiento de los objetivos, los cuales servirán para poder dirigir la investigación, el planteamiento de la hipótesis, los cuales son supuestos a los que probablemente se confirmarán con la investigación, operacionalización de las variables, el cual nos mostrará las variables que serán medidas (véase en la Tabla N°1), búsqueda de la bibliografía, y la elaboración del diseño experimental, el cual nos permitirá identificar y cuantificar el efecto de nuestras variables sobre la investigación.

En la *figura 3* se verifica la fase experimental que empieza por la recolección de la muestra, la cual se empleó para determinar la cantidad de Cr^{+6} que tiene, así como aislar las bacterias nativas y *Pseudomona putida*. Posterior a ello se identifican las bacterias y se las inocula en vasos precipitados con aguas residuales de curtiembre, y se realizan mediciones diarias durante 5 días. Finalmente se realizan los análisis estadísticos de los datos, para luego realizar las discusiones y las conclusiones de la investigación.

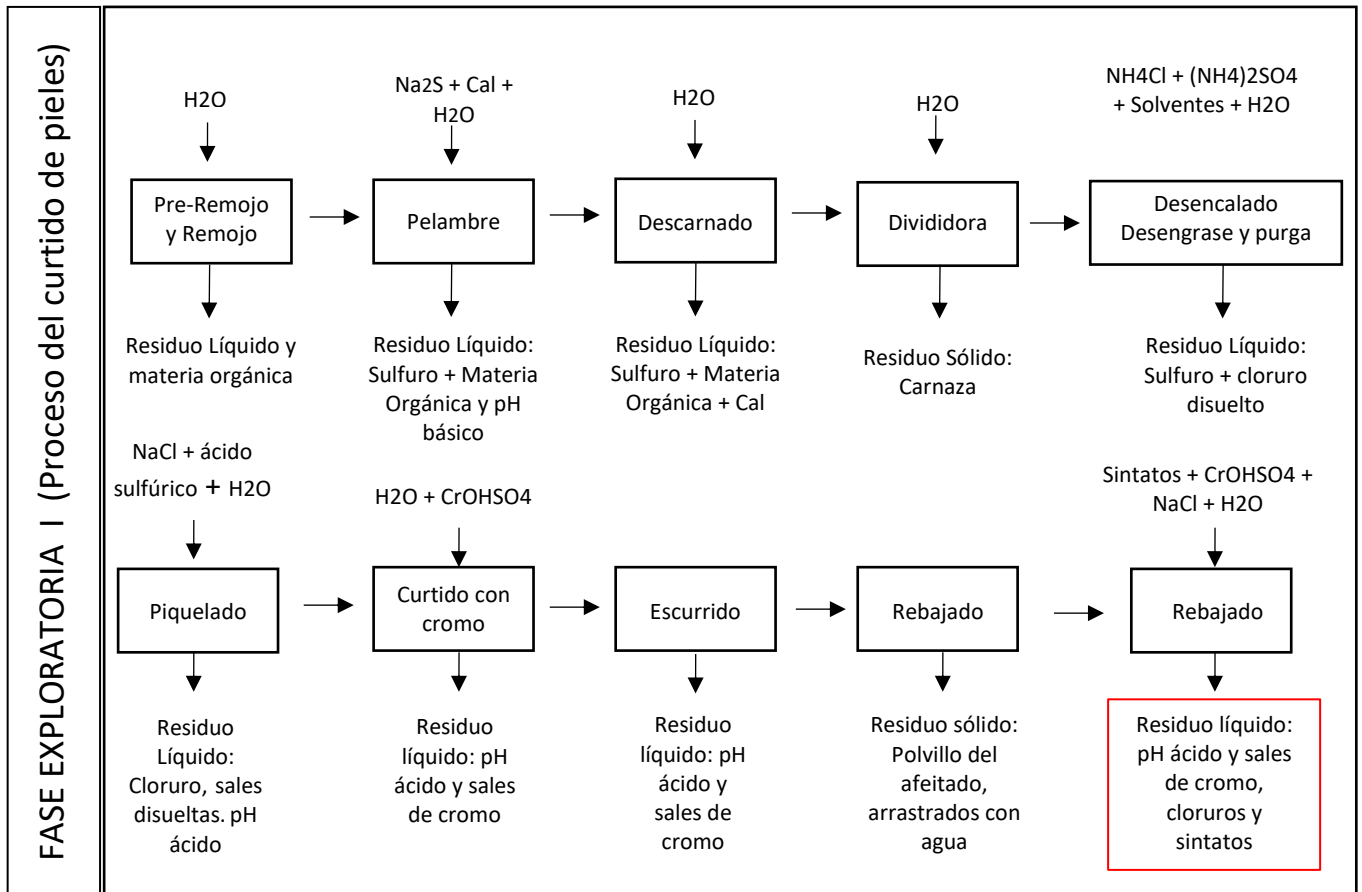


Figura 1. Fase exploratoria I.
Fuente: Elaboración propia

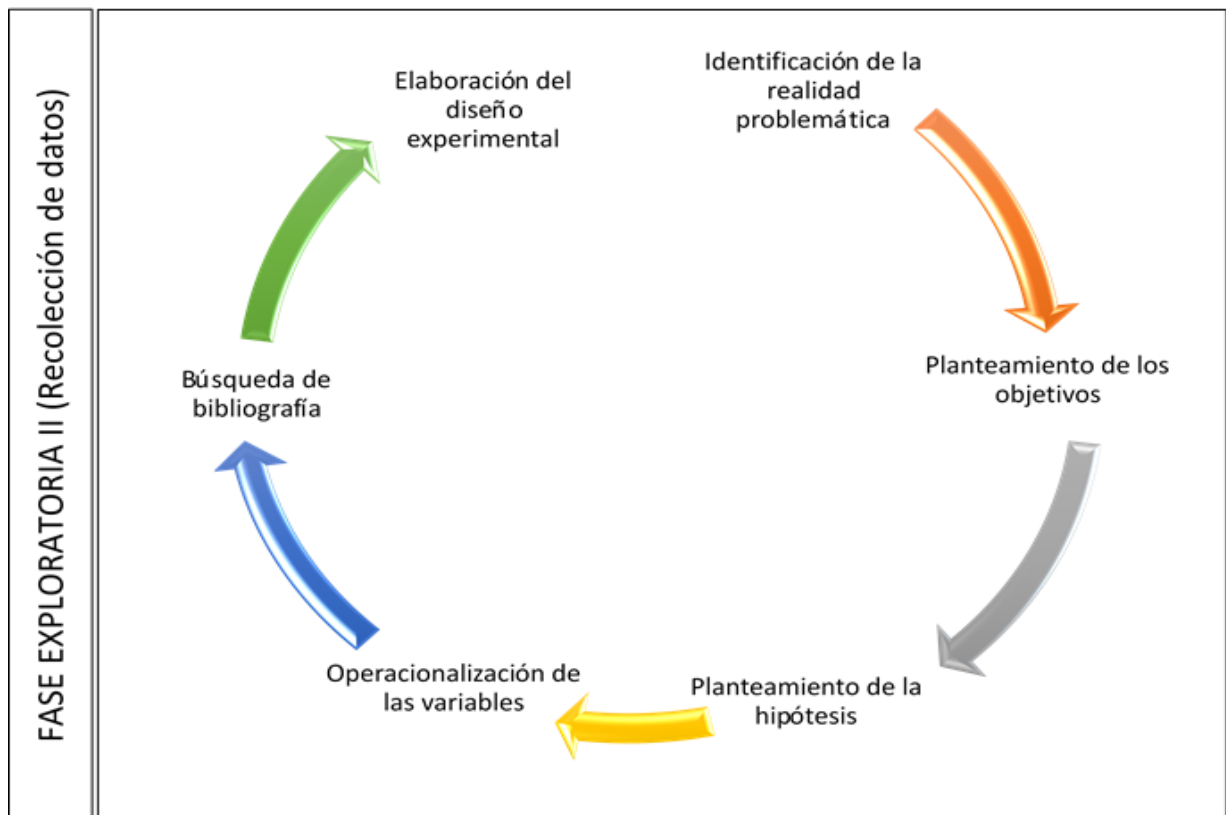


Figura 2. Fase exploratoria II.
Fuente: Elaboración propia

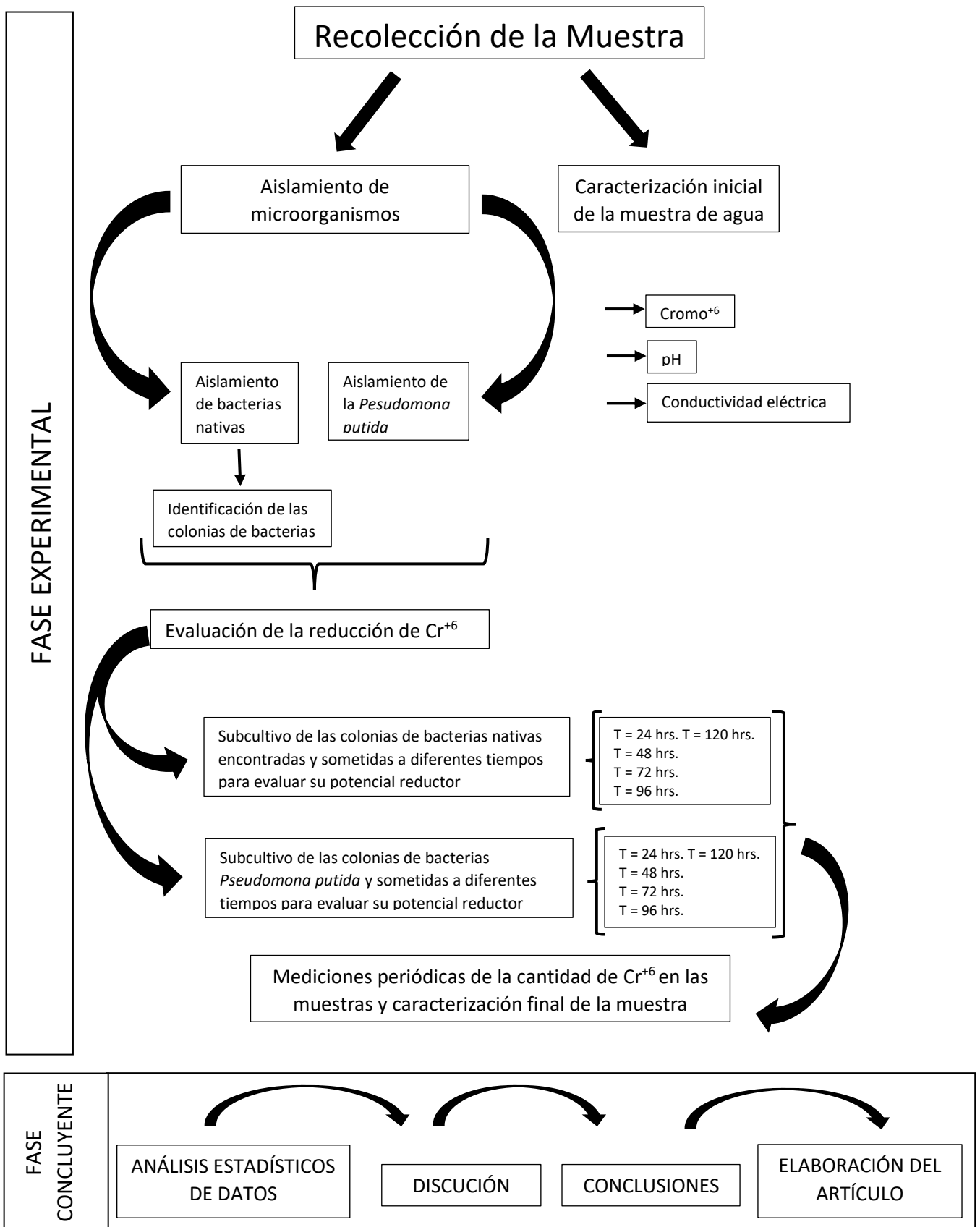


Figura 3. Fase experimental y Fase concluyente
Fuente: Elaboración propia

3.2. Variables y Operacionalización

Tabla 1. Matriz de operacionalización de variables

PROBLEMA		HIPÓTESIS	OBJETIVO							
GENERAL	¿Qué microorganismos resultan ser eficientes para reducir Cr+6 de las aguas residuales de una curtiembre de la localidad de Huachipa?	Los microorganismos nativos patógenos frente a la <i>Pseudomona putida</i> son más eficientes para la reducción del contenido de Cr+6 de las aguas residuales de una curtiembre.	Determinar cuáles son los microorganismos nativos frente a la <i>Pseudomona putida</i> que resultan ser más eficientes en la reducción de Cr+6 de las aguas residuales de una curtiembre.							
PROBLEMA		HIPÓTESIS	OBJETIVOS		VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	INSTRUMENTO	ESCALA DE MEDICIÓN	
ESPECÍFICA 1	¿Cuál es la influencia que el tiempo ejerce sobre la reducción de Cr+6 de aguas residuales de una curtiembre por microorganismos nativos frente a la <i>Pseudomona putida</i> ?	El tiempo influye en la reducción de Cr+6 por microorganismos nativos frente a la <i>Pseudomona putida</i> .	Corroborar si el tiempo influencia en la reducción de Cr+6 de aguas residuales de una curtiembre por microorganismos nativos frente a la <i>Pseudomona putida</i> .		INDEPENDIENTE	Microorganismos nativos y la <i>Pseudomona sp.</i>	Condiciones de aclimatación	T°	Ficha de Observación	°C
							Condiciones de tratamiento	pH		Unidad de pH
								Nutrientes		Gramos
							Identificación de grupos de bacteria	Maldi - TOF		
T°	°C									
pH	Unidad de pH									
ESPECÍFICA 2	2. ¿Cuál es la combinación de microorganismos nativos que resulta más eficiente frente a la <i>Pseudomona putida</i> en la reducción del contenido de Cr+6 de las aguas residuales de una curtiembre?	La combinación de 3 microorganismos nativos es más eficiente frente a la <i>Pseudomona putida</i> en la reducción del contenido de Cr+6 de las aguas residuales de una curtiembre	Verificar que una combinación de 3 microorganismos nativos es más eficiente frente a la <i>Pseudomona putida</i> en la reducción del contenido de Cr+6 de las aguas residuales de una curtiembre.		DEPENDIENTE	Reducción de Cr+6	Cantidad de Cr+6 en los sistemas de tratamiento	Concentración inicial de en las aguas residuales Cr+6 de curtiembre en la localidad de Huachipa	Ficha de Observación	mg/l
								Concentración final de Cr+6 en las aguas residuales de curtiembre en la localidad de Huachipa		mg/l

Fuente: Elaboración propia

3.3. Población, muestra y muestreo

En una investigación, la población es el conjunto universo que se quiere investigar, estos pueden ser personas, objetos, animales, registros, accidentes, etc. (López, 2004, p.69). La población puede ser finita, si es que se tiene la cantidad exacta del conjunto universo, o infinita si es que no se tiene la cantidad exacta del conjunto universo. Es por ello que, en el presente trabajo de investigación, debido a que no se tuvo registro de la cantidad de los miles de litros de agua, la población sería toda el agua de curtiembre que se descarga, siendo considerada como una población infinita.

Así mismo, la muestra es un subgrupo que posee las características representativas de la población, dicha muestra debe ser seleccionada al azar o de forma aleatoria, el motivo por el cual se selecciona una muestra en un trabajo de investigación es por la economía de tiempo y recursos (Hernández, Fernández y Baptista, 2014, p. 175). Por ello la muestra de la investigación fue recogida de modo aleatoria simple, para ello se extrajo 12 litros de agua residual de la curtiembre ubicada en el distrito de Ate Vitarte ($12^{\circ}01'36.7''S$ y $76^{\circ}53'37.7''W$), los cuales fueron llevados en un frasco ámbar al laboratorio de la Universidad César Vallejo y se usaron para el análisis, determinando el grado de contaminación de Cr^{+6} y posteriormente fueron usadas para el tratamiento de las mismas. Adicional a ello, fue empleado para el aislamiento de las bacterias nativas capaces de reducir Cr^{+6} en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Así mismo, el muestreo probabilístico es el que asegura que las muestras sean representativas, dentro de ella se encuentra el muestreo por azar simple, mediante el cual se eligen al azar los elementos de la población que van a conformar parte de la muestra (Argibay, 2009, p. 15). Para la selección de la muestra se empleó el muestro probabilístico de azar simple.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.

La observación directa es un método mediante el cual el investigador elige un fenómeno que le interesa para identificarlo, clasificarlo y registrarlo en un situación

natural o preparada (Mejía, 2005, p. 76). Es por ello que la técnica que se empleó fue la observación experimental.

Por otro lado, con la denominación general de instrumentos de acopio de datos, se nombra a todos aquellos instrumentos que sirven para realizar las mediciones de las variables, la cual nos permite obtener información relacionado a ellas o solamente observar el comportamiento de las mismas. (Mejía, 2005, p. 19). El instrumento que se utilizó fue la ficha de investigación en la cual se anotaron las lecturas de la cantidad de cromo hexavalente que se analizó en el espectrofotómetro de luz UV-visible del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad César Vallejo, el cual permitió cuantificar en mg/L.

3.5. Procedimiento

De los 12 litros de muestra recolectada, para el aislamiento de las bacterias nativas se empleó 1 litro de la muestra representativa. Se filtró con papel filtro N° 40 empleando el embudo para separar la parte líquida de la parte sólida; después mediante la técnica de diluciones sucesivas se cultivó en Agar Luria-Bertani y fue embebida con 5 ml de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) de 50ug/ml, se colocó en la incubadora a 37°C hasta que se desarrollen colonias de bacterias. Al cabo de 8 días se desarrollaron 3 colonias bien diferenciadas, las cuales luego fueron subcultivadas para ser purificadas, así mismo la otra parte fue cultivada en Agar King de donde se aislaron colonias de la *Pseudomona putida* y luego fue subcultivada hasta tener colonias exclusivas. Al final del proceso de aislamiento y acondicionamiento, las colonias nativas fueron identificadas mediante espectrometría de masas MALDITOF en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología Marino Tabusso.

Para la medir el potencial de reducción del Cr+6 a las tres colonias de microorganismos obtenidos en el aislamiento y acondicionamiento se las permutó y subcultivó, obteniendose 7 combinaciones distintas, las que luego fueron inoculadas 5 ml de las mismas en 100 ml de la muestra de agua en vasos precipitados, así mismo se repitió

el proceso con las colonias de *Pseudomona putida*, todas las pruebas se realizaron por triplicado para mejorar la precisión analítica.

3.6 Métodos de análisis de datos

Se extrajeron 10 ml de muestras cada 24 horas durante 5 días y se evaluó la cantidad de Cr^{+6} que contenía mediante espectrofotometría, tanto en las muestras de las colonias de microorganismos nativos como las de la *Pseudomona putida*. La cantidad de Cr^{+6} reducido, se colocaron en una ficha de observación y transcritos en una tabla de Excel y mediante una gráfica se evaluó la tendencia de reducción en cada una de las muestras Cr^{+6} . Los resultados obtenidos se compararon con trabajos anteriores, así como con los Límites Máximos Permisibles y Valores referenciales para las actividades industriales de cemento, cerveza, curtiembre y papel (LPM) para el agua según D.S. N° 003-2002-PRODUCE, y finalmente se calculó la eficiencia de las colonias, tanto de las bacterias nativas como la de la *Pseudomona putida*.

Mediante el programa Minitab 18 se determinó la relación que existe en los resultados pre-test/post test, mediante los datos de desviación típica, valores máximos y mínimos; para ello se usó el método de ANOVA de un factor para verificar el contraste de las hipótesis y la prueba de tukey para para verificar la relación de confianza las diferentes colonias permutadas.

3.7. Aspectos éticos

Los resultados finales del trabajo de investigación fueron mostrados públicamente para que puedan consultar o corroborar, dependiendo de lo que necesiten. Cada información ha sido citada correctamente en cumplimiento del Manual ISO.UCV.2017.

En cuanto al análisis de la cantidad de Cr^{+6} , fueron ejecutados en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad César Vallejo, se realizó conforme al protocolo de Monitoreo y los resultados fueron datos reales sin ser inventados ni alterados. La investigación y elaboración de este trabajo pretende aportar conocimientos que

permitirán la mejorar los procesos industriales, y de esta manera contribuir a la mejorar el medio ambiente, realizando actividades sostenibles.

IV. RESULTADOS

4.1. Absorción de Cr^{+6} por *Pseudomona putida*, *Kocuria rosea*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Micrococcus luteus* y sus respectivas combinaciones.

La bacteria *Kocuria rosea* tuvo una reducción del Cr^{+6} más eficiente desde el primer día, seguida por la combinación entre la *Kocuria rosea* y el *Planomicrobium okeanokoites*, mientras que la combinación entre la *Kocuria rosea* y el *Micrococcus luteus* fue la que tuvo menor porcentaje de reducción en comparación con las demás bacterias y sus respectivas combinaciones. (Véase en la figura 4). Así mismo los mayores porcentajes de reducción que se tuvo fue de 21.16% por la *Kocuria rosea* y de 12.46% por la combinación entre la *Kocuria rosea* y *Planomicrobium okeanokoites*, mientras que los menores porcentajes de reducción fueron de 4.8% por la combinación entre la entre la *Kocuria rosea* y el *Micrococcus luteus* así como de 8.57%. Por otro lado la reducción de Cr^{+6} que ejerció la *Pseudomona putida* fue de 10.64% (véase en la tabla 2). Nota: La iniciales Pp, Kr, Po y MI, corresponden a *Pseudomona putida*, *Kocuria rosea*, *Planomicrobium okeanokoites* y *Micrococcus luteus*, respectivamente.

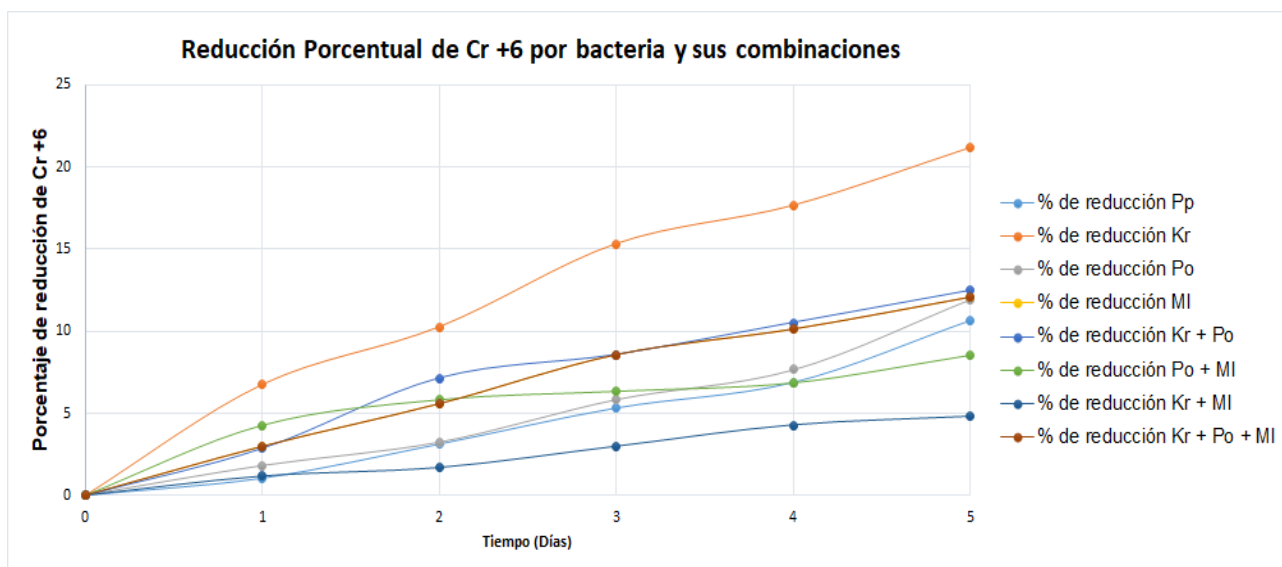


Figura 4. Reducción porcentual de Cr^{+6} por bacterias y sus combinaciones. Fuente: Elaboración propia

Tabla 2. Porcentaje promedio de la reducción de Cr⁶⁺ por bacteria

Tiempo (Día)	% de reducción Pp	% de reducción Kr	% de reducción Po	% de reducción MI	% de reducción Kr + Po	% de reducción Po + MI	% de reducción Kr + MI	% de reducción Kr + Po + MI
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1.04	6.75	1.82	2.99	2.86	4.28	1.17	2.99
2	3.12	10.25	3.24	5.58	7.14	5.84	1.69	5.58
3	5.32	15.32	5.84	8.57	8.57	6.36	2.99	8.57
4	6.88	17.65	7.66	10.13	10.51	6.88	4.28	10.13
5	10.64	21.16	11.94	12.07	12.46	8.57	4.80	12.07

Fuente: Elaboración propia

4.2. Análisis estadísticos para el objetivo general y específico 1 (Determinar qué microorganismo es más eficiente frente a la *Pseudomona putida*, y determinar qué combinación de microorganismos es más eficiente frente a la *Pseudomona putida* en la reducción de Cr⁶⁺)

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de ANOVA de un solo factor, para ello primero se validó el cumplimiento de los 3 supuestos (Tratamientos independientes, distribución normal y homocedasticidad)

4.2.1. Prueba de ANOVA

Una vez comprobado el cumplimiento de los 3 supuestos, se realizó la prueba de ANOVA (comparación de medias). Siendo las hipótesis nula y alterna:

H₀: Las medias son iguales

H_a: No todas las medias son iguales

Si:

* El valor $p > 0.05$, se acepta la hipótesis nula.

* El valor $p < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

Método		Análisis de Varianza					
Hipótesis nula	Todas las medias son iguales	Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales	Bacteria	7	447.8	63.97	4.28	0.008
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$		Error	16	239.2	14.95		
<i>Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.</i>		Total	23	687.0			

Figura 5. Prueba de ANOVA de reducción de Cr⁶ por bacterias.

Interpretación:

Se observó que el valor del estadístico es 4.28, lo que da como resultado un valor p = 0.008 y que al ser menor que el nivel de significancia, se puede inferir que existe evidencia científica para rechazar la hipótesis nula, con lo que existe al menos una bacteria que realiza una reducción significativa del Cr⁶.

Para determinar estadísticamente cuál de las bacterias o de sus combinaciones realiza una reducción significativa del Cr⁶ se realizó la prueba de Tukey el cual nos permitió agrupar en parejas la información de las medias y realizar las comparaciones entre cada una de las pruebas.

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<u>Bacteria</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
Kr	3	21.16	A
Kr + Po	3	12.46	A B
MI	3	12.07	A B
Po	3	11.94	A B
Kr + MI + Po	3	10.91	A B
Pp	3	10.64	A B
Po + MI	3	8.57	B
Kr + MI	3	4.80	B

Figura 6. Prueba de Tukey para la comparación de parejas de medias de bacterias.

Interpretación:

La *Kocuria rosea*, *Planomicrobium okeanoikoites* + *Micrococcus luteus* y *Kocuria rosea* + *Micrococcu luteus* no comparten la misma letra, por lo que hay diferencia significativa de medias entre ellas, así mismo se puede inferir que estadísticamente las medias entre las demás bacterias y sus respectivas combinaciones son iguales.

4.3. Análisis estadísticos para objetivo específico 2 (Influencia del tiempo en la reducción de Cr⁺⁶)

4.3.1. Prueba de Kruskall - Wallis

Debido a que los datos no tuvieron una distribución normal, se realizó la prueba de Kruskall-Wallis (comparación de medias para datos con una distribución no normal). Siendo las hipótesis nula y alterna:

H₀: Las medias son iguales

H_a: No todas las medias son iguales

Si:

* El valor $p > 0.05$, se acepta la hipótesis nula.

* El valor $p < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

Estadísticas descriptivas					Prueba				
TIEMPO	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z	Hipótesis nula	H ₀ : Todas las medianas son iguales			
1	8	2.33645		23.4	0.78	Hipótesis alterna H ₁ : Al menos una mediana es diferente			
2	8	1.81767		20.3	-0.07	<u>Método</u>	<u>GL</u>	<u>Valor H</u>	<u>Valor p</u>
3	8	1.88143		18.0	-0.68	No ajustado para empates	4	1.86	0.761
4	8	1.68753		17.5	-0.81	Ajustado para empates	4	1.87	0.760
5	8	2.14174		23.4	0.78				
General	40			20.5					

Figura 7. Prueba de Kruskall – Wallis para la reducción de Cr⁺⁶ en el tiempo

Interpretación:

Se observó que el valor $p = 0.761$ para datos sin ajustes y el valor $p = 0.760$ para datos ajustados. Para dichos valores, al ser mayores que el nivel de significancia, se puede inferir que existe evidencia estadística para aceptar la hipótesis nula, con lo que la media de reducción de Cr^{+6} en cada uno de los tiempos es igual. Concluyendo que el tiempo no es un factor que influye en la reducción del Cr^{+6} .

V. DISCUSIONES

En el presente trabajo se pudo observar que un microorganismo aislado de la misma agua de curtiembre con concentración de cromo hexavalente y expuesta a las mismas condiciones en las que fue encontrada en dicha agua de curtiembre, llegaron a reducir desde 4.8% hasta 21.16% de Cr^{+6} , las bacterias encontradas fueron: *Kocuria rosea*, *planomicrobium okeanokoites* y *Micrococcus luteus*, degradando 21.16%, 11.94% y 12.07% respectivamente; las combinaciones realizadas corresponden a *Kocuria rosea* + *planomicrobium okeanokoites*, *Planomicrobium okeanokoites* + *Micrococcus luteus*, *Kocuria rosea* + *Micrococcus luteus* y finalmente *Kocuria rosea* + *Planomicrobium okeanokoites* + *Micrococcus luteus*, degradando 12.46%, 8.57%, 4.8% y 10.9% respectivamente. Thacker *et al* en su trabajo de investigación en donde aislaron una bacteria nativa, la cual fue identificada como *Providencia sp*, de aguas residuales, llegó a reducir el cromo hasta un 99.31% en un tiempo de 144 horas, pero en condiciones ideales de pH y temperatura (fisiológicas), concluyendo que esta bacteria podría ser un potencial reductor de cromo hexavalente.

Mientras que en otra investigación realizada por Islas y Bojórquez obtuvieron resultados en 12 días, en los cuales las bacterias nativas que aislaron redujeron un máximo de 33.59%. Las bacterias que encontraron Islas y Bojórquez son Gram negativas, lo cual es una constante en trabajos de otros autores. El motivo por el que pueda existir dicha similitud es que las bacterias Gram negativas tienen una doble membrana a diferencia de las Gram positivas, ello les podría proporcionar resistencia a medios adversos además de la facultad de poder agruparse en cadenas o pares.

Por otro lado, en la investigación de Kumaresan *et al*, emplearon bacterias alcalinas aisladas de aguas de curtiembre, las cuales fueron identificadas como *Bacillus cohnii* y *Bacillus licheniformis*, y lograron reducir el 77% y 79% de Cr^{+6} respectivamente, dichas bacterias fueron evaluadas en un tiempo menor a 25 horas, sin embargo, esta reducción fue realizada en un efluente de baja concentración de Cr^{+6} (12, 44 mg/ml) ya un pH preestablecido.

En una investigación realizada por Mayta y Vela, verificaron que la *Pseudomona putida* logró reducir en 6 días hasta el 10% de la cantidad de cromo inicial y a los 26 días remover hasta el 90% de la cantidad de cromo inicial, lo cual fue una reducción equiparable con la de la *Pseudomona putida* empleada en el presente trabajo, en donde redujo 10.64% en 5 días de prueba.

En cuanto el estudio realizado por Guerrero *et al* en donde aislaron bacterias de aguas residuales y que mediante la técnica molecular de secuenciación del gen 16sRNA se identificaron como *Paenibacillus sp*, *Bacillus amyloliquefaci* concentraciones con altas concentraciones cromo hexavalente (25mg/L, 60 mg/L y 100 mg/L) y a condiciones ideales establecidas. Al final de la prueba realiza, después 168 horas realizaron el análisis de los datos mediante ANOVA obteniendo un p menor a 0.05 con un nivel de confianza de 95%, concluyendo que lograron reducir el 83.05%, 80.95% y 79.52% respectivamente, pero al realizar la interpolación se puede verificar que en 5 días redujeron un 20% aproximadamente, lo cual es un valor similar al de los microorganismos empleados en esta investigación.

Una de las principales diferencias que existen entre las bacterias aisladas en distintas investigaciones, es que resultan ser Gram negativas, mientras que las bacterias aisladas en este trabajo son Gram positivas, lo que podría influenciar en la cantidad reducida de Cr^{+6} . Tal como lo menciona López *et al*, las bacterias Gram positivas poseen cargas positivas que favorecen la interacción con moléculas de cargas negativas, mientras que las negativas poseen una doble membrana en su pared celular (2008, p. 53).

Cabe resaltar que en todos los trabajos realizados los investigadores ajustaron el pH y la temperatura a las condiciones favorables para el desarrollo de los microorganismos, sin embargo, en la presente investigación los microorganismos se desarrollaron a temperatura ambiente y pH original de la muestra, por lo que ambos factores físicoquímicos pueden influenciar en el rendimiento de la reducción de cromo hexavalente.

VI. CONCLUSIONES

- Los organismos aislados del agua de curtiembre fueron: *Kocuria rosea*, *Planomicrobium okeanokoites* y *Micrococcus luteus*, estos 3 microorganismos son bacterias Gram positivas.
- Se determinó que el microorganismo nativo más eficiente en la reducción del Cr^{+6} de aguas de curtiembre frente a la *Pseudomonas putida*, es la *Kocuria rosea*, ello se puede corroborar al verificar que la cantidad de Cr^{+6} que redujo la *Kocuria rosea* es de 21.16% frente a la *Pseudomonas putida* que es de 10.64%. Lo cual estadísticamente es significativo.
- Ninguna de las combinaciones de los microorganismos aislados de las aguas de curtiembre resultó ser estadísticamente más eficiente que la *Pseudomonas putida*, ya que, si bien es cierto que porcentualmente hay una ligera diferencia, estadísticamente no existen diferencias significativas, sino que, por el contrario, tenían la misma eficiencia.
- Por último, la reducción de Cr^{+6} en el tiempo daba como resultado que cada día tenían reducciones similares, y al realizar la prueba estadística se encontró que estadísticamente tenían la misma media, por lo que el tiempo no influenciaba en la reducción diaria del Cr^{+6} .

VII. RECOMENDACIONES

- Ampliar la cantidad de días en los que se evalúa la eficiencia de los microorganismos nativos en cuanto a la reducción de Cr^{+6} para una mayor recolección de data y un mejor análisis.
- Se recomienda realizar la investigación mediante biorreactores a escala para dar paso al siguiente nivel de investigación en los que se pueda interactuar con distintos factores fisicoquímicos.
- Se recomienda realizar análisis de FTIR, para determinar cuáles son los grupos funcionales antes y después de reducir el Cr^{+6} así como análisis de microscopía SEM y de esa manera analizar el mecanismo de función de los microorganismos nativos encontrados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SAWALHA Hassan *et al.* Waste biorefinery [en línea]. Oxford: Elsevier, 2020 [fecha de consulta: 16 de abril de 2020]. Capítulo 25. Tannert wastewater treatment and resource recovery option. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128182284000253>

ISBN

978-0-12-818228-4

SARANRAJ and Sujitha, D. Microbial Bioremediation of Chromium in Tannery Effluent: A Review. *International Journal of Microbiological Research* [En línea]. Volumen 4, N°3, diciembre del 2013. [Fecha de consulta: 16 de abril de 2020].

Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/259757026_Microbial_Bioremediation_of_Chromium_in_Tannery_Effluent_A_Review

ISSN

2079-2093

BANSAL, Neetu; Coetzee, Johan & Chirwa, Evans. In situ bioremediation of hexavalent chromium in presence of iron by dried sludge bacteria exposed to high chromium concentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. [En línea]. Vol. 172, mayo de 2019. [Fecha de consulta: 16 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651319301228>

ISSN

0147-6513

BHARAGAVA, Ram & Mishra, Sandhya. Hexavalent chromium reduction potential of *Cellulosimicrobium sp.* isolated from common effluent treatment plant of tannery industries. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. [En línea]. Vol. 147, enero de 2018. [Fecha de consulta: 16 de abril de 2020].

Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651317305365>

ISSN

0147-6513

WHITEHEAD, P. *et al.* Modelling heavy metals in the Buriganga River System, Dhaka, Bangladesh: Impacts of tannery pollution control. *Science of Total Environment*. [En línea]. Vol. 697, 20 de diciembre de 2019. [Fecha de consulta: 16 de abril de 2020].

Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719340677>

ISSN

0048-9697

KALHOR, Koosha. *et al.* Assessment of groundwater quality and remediation in karst aquifers: A review. *Groundwater for sustainable development*. [En línea]. Vol. 8, abril de 2018. [Fecha de consulta: 16 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352801X18301632?via%3Dihub>

ISSN

2352-801X

DEY, Priyadarshini *et al.* Comparative performance evaluation of multi-metal resistant fungal strains for simultaneous removal of multiple hazardous metals. *Journal of Hazardous Materials*. [En línea]. Vol. 318, 15 de noviembre del 2016. [Fecha de consulta: 17 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030438941630646X>

ISSN

0304-3894

CÓRDOVA, Hansel *et al.* Tratamiento de las aguas residuales del proceso de curtido tradicional y alternativo que utiliza a complejantes de cromo. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. [En línea]. Vol. 80. N°3, setiembre del 2014. [Fecha de consulta: 17 de abril de 2020]. Disponible en:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2014000300005

ISSN

1810-634X

REY DE CASTRO, Ana. Recuperación de cromo (III) de efluentes de curtido para control ambiental y optimización del proceso productivo. Tesis (Licenciado en Química). Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú, 2013.

Disponible en: <http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/5123>

WISE, James; Shi, Xianglin y Zhuo, Zhang. Toxicology of Chromium (VI) [En línea]. 2da. Edición. Michigan: Elsevier, 2019 [Fecha de consulta: 20 de abril de 2020]. Encyclopedia of Environmental Health.

Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095489114551>

ISBN

9780444639516

PALAZÓN, Irene *et al.* Procedimiento de validación de un método para cuantificar cromo en suero por espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica. *Revista del Laboratorio Clínico*. [En línea]. Vol. 8. N°8, enero – marzo 2015. [Fecha de consulta: 19 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1888400814001123>

ISSN
1888-4008

DA ROCHA, Glalber; Vendruscolo, Francielo y Antoniosi, Nelson. Biosorption of hexavalent chromium by *Pleurotus ostreatus*. *Heliyon*. [En línea]. Vol. 5. N°3, Marzo de 2019. [Fecha de consulta: 20 de abril de 2020]. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844018348576>

ISSN
2405-8440

MOLINA, Nancy; Aguilar, Patricia y Cordovez, Clemencia. Plomo, cromo III y cromo VI y sus efectos sobre la salud humana. *Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular*. [En línea]. Vol. 8. N°1, enero - junio de 2010. [Fecha de consulta: 20 de abril de 2020]. Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5599145>

ISSN
1692-8415

MOHAN, Dinesh et al. Modeling and evaluation of chromium remediation from water using low cost bio-char, a green adsorbent. *Journal of Hazardous Materials*. [En línea]. Vol. 188. N°1-3, 15 de abril de 2011. [Fecha de consulta: 20 de abril de 2020]. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389411001762>

ISSN
0304-3894

MOHAN, Dinesh y Pittman, Charles. Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *Journal of Hazardous Materials*. [En línea]. Vol.137. N° 2, 21 de septiembre de 2006. [Fecha de consulta: 21 de abril de 2020]. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389406006996>

ISSN
0304-3894

SILVEIRA, Camila et al. Electrodialysis for removal of chromium (VI) from effluent: Analysis of concentrated solution saturation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. [En línea]. Vol. 7. N° 5, octubre de 2019. [Fecha de consulta: 21 de abril de 2020]. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213343719305032>

ISSN
2213-3437

CAVIEDES, Diego *et al.* Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales. Una Revisión. *Revista Ingeniería y Región*. [En línea]. Vol. 13. N° 1, 09 de septiembre de 2015. [Fecha de consulta: 21 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://journalusco.edu.co/index.php/iregion/article/view/710>

ISSN

1657-6985

ZEWAIL, T y Yousef, N. Kinetic study of heavy metal ions removal by ion exchange in batch conical air spouted bed. *Alexandria Engineering Journal*. [En línea]. Vol. 54. N° 1, marzo de 2015. [Fecha de consulta: 21 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110016814001227>

ISSN

1110-0168

RAMÍREZ-GARCÍA, Robert; Gohil, Nisarg, & Singh, Vijai. Phytomanagement of Polluted Sites. [En línea]. Oxford: Elsevier, 2019. [fecha de consulta: 22 de abril de 2020]. Capítulo 21. Recent Advances, Challenges, and Opportunities in Bioremediation of Hazardous Materials. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128139127000211>

ISBN

978-0-12-813912-7

KUN, Yin *et al.* Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal*. [En línea]. Vol. 360, 15 de marzo de 2019. [Fecha de consulta: 22 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1385894718321909>

ISSN

1385-8947

FERNÁNDEZ, Isabel. Estudio del metabolismo de polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas putida*: implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos funcionalizados. Tesis para obtener el grado de doctor. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2012. Disponible en:

<https://eprints.ucm.es/16903/1/T33991.pdf>

MOLINA, Dalia *et al.* Pseudomonas putida estimula el crecimiento de maíz en función de la temperatura. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. [En línea]. Vol. 4. N°1, febrero del 2017. [Fecha de consulta: 18 de abril de 2020]. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/313878323_Pseudomonas_putida_estimula_el_crecimiento_de_maiz_en_funcion_de_la_temperatura

ISSN

2334-2501

RAMIREZ, Martha, *et al.* Reducción bacteriana de cromo hexavalente: Mecanismos y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*. [En línea]. Vol. 28. N°3, septiembre del 2009. [Fecha de consulta: 17 de abril de 2020]. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/312318722_Reducccion_bacteriana_de_cromo_hexavalente_mecanismos_y_aplicaciones

ISSN

1665-1995

ELAHI, Amina y Rehman, Abdul. Multiple metal resistance and Cr 6+ reduction by bacterium, *Staphylococcus sciuri* A-HS1, isolated from untreated tannery effluent. *Journal of King Saud University - Science*. [En línea]. Vol. 31. N° 4, Octubre de 2019. [Fecha de consulta: 17 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364718311522>

ISSN

1018-3647

SANJAY, Maria *et al.* Isolation and identification of chromium reducing bacteria from tannery effluent. *Journal of King Saud University - Science*. [En línea]. Vol. 32. N°1, Enero de 2020. [Fecha de consulta: 17 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364717306742>

ISSN

1018-3647

WANI, Parvaze *et al.* Investigation of the role of chromium reductase for Cr (VI) reduction by *Pseudomonas* species isolated from Cr (VI) contaminated effluent. *Biotechnology Reserach and Innoation*. [En línea]. Vol. 3. N°1, enero – junio de 2019. [Fecha de consulta: 27 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S245207211830128X>

ISSN

2452-0721

YAASHIKAA, P.; Senthil, P. y Saravanan A. Molecular characterization of chromium resistant gram-negative bacteria isolated from industrial effluent: Bioremedial activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. [En línea]. Vol. 80. 25 de diciembre de 2019. [Fecha de consulta: 27 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1226086X19304526>

ISSN

1226-086X

ZHENG, Zen *et al.* A *Bacillus subtilis* strain can reduce hexavalent chromium to trivalent and an *nfrA* gene is involved. *International Biodeterioration & Biodegradation*. [En línea]. Vol. 97. Enero - febrero de 2015. [Fecha de consulta: 27 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830514003242>

ISSN

0964-830

ISLAS, Marina y Bojórquez, Rocío. Bacterias reductoras de Cr⁺⁶ y su potencial biotecnológico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. [En línea]. Vol. 27, N° 3, agosto del 2011. [Fecha de consulta: 27 de abril del 2020]. Disponible en:

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992011000300008)

[49992011000300008](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992011000300008)

ISSN

0188-4999

KUMARI, Vineeta., *et al.* (2016). Genotoxicity evaluation of tannery effluent treated with newly isolated hexavalent chromium reducing *Bacillus cereus*. *Journal of Environmental Management*. [En línea]. Vol. 183. N°1, diciembre del 2016. [Fecha de consulta: 27 de abril del 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479716305552>

ISSN

0301-4797

SU, *et al.* Cr(VI) reduction in chromium-contaminated soil by indigenous microorganisms under aerobic condition. *Transactions of nonferrous metals society of China*. [En línea]. Vol. 29. N°6, julio de 2019. [Fecha de consulta: 27 de abril del 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1003632619650375>

ISSN

1003-6326

QU, Yingmin *et al.* Removal of hexavalent chromium from wastewater using magnetotactic bacteria. *Separation and Purification Technology*. [En línea]. Vol. 136, 5 de noviembre del 2014. [Fecha de consulta: 27 de abril del 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138358661400481X>

ISSN

1383-5866

KUMARESAN, Sarankumar. Bioreduction of hexavalent chromium by chromium resistant alkalophilic bacteria isolated from tannery effluent. *Journal of King Saud*

University - Science. [En línea]. Vol. 32. N°2, abril de 2020. [Fecha de consulta: 17 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364720300598>

ISSN

1018-3647

VARGAS, Zoila. La investigación aplicada: una forma de conocer las realidades con evidencia científica. *Revista Educación*. [En línea]. Vol. 33. N° 1, 2009. [Fecha de consulta: 27 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44015082010>

ISSN

0379-7082

TAM, Jorge; Vera, Giovanna y Oliveros, Ricardo. Tipos, métodos y estrategias de investigación científica. *Pensamiento y acción*. [En línea] Vol. 5. N° 1, 2008. [Fecha de consulta: 27 de abril de 2020]. Disponible en:

http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/articulos/imarpe/oceanografia/adj_modela_pa-5-145-tam-2008-investig.pdf

LÓPEZ, Pedro. Población, muestra y muestreo. *Punto cero*. [En línea] Vol. 9. N° 8, 2004. [Fecha de consulta: 27 de abril de 2020]. Disponible en:

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=s1815-02762004000100012&script=sci_arttext

ISSN

1815-0276

HERNÁNDEZ, Roberto; Fernández, Carlos y Baptista, Pilar. Metodología de la investigación [En línea]. 6ta. Edición. México: McGraw-Hill. [fecha de consulta: 16 de abril de 2020]. Capítulo 8. Selección de muestra. Disponible en:

http://metabase.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/2776/506_6.pdf?sequence=1

ISBN

978-1-4562-2396-0

MEJÍA, Elías. Técnicas e instrumentos de investigación [En línea]. Lima: UNMSM, noviembre de 2005. [fecha de consulta: 25 de abril de 2020]. Capítulo 1. Instrumentos de Acopio de Datos. Disponible en:

<http://online.aliat.edu.mx/adistancia/InvCuantitativa/LecturasU6/tecnicas.pdf>

ISBN

9972-834-08-05

ARGIBAY, Juan. Muestra en investigación cuantitativa. *Subjetividad y Procesos Cognitivos*. [En línea]. Vol. 13. N° 1, 19 de noviembre de 2009. [Fecha de consulta: 27 de abril de 2020]. Disponible en:

<http://dspace.uces.edu.ar:8180/xmlui/handle/123456789/719>

ISSN

1666-244X

THACKER, Urvashi *et al.* Hexavalent chromium reduction by *Providencia sp.* *Process Biochemistry*. [En línea]. Vol. 41. N°6, junio del 2006. [Fecha de consulta: 30 de abril de 2020]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511306000122>

ISSN

1359-5113

GUERRERO, Deisy *et al.* Eficiencia en la reducción de Cromo por una bacteria silvestre en un tratamiento tipo Batch utilizando como sustrato agua residual del municipio de Pasto, Colombia. *Universidad y salud*. [En línea]. Vol. 41. N°6, marzo de 2017. [Fecha de consulta: 30 de abril de 2020]. Disponible en:

<http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v19n1/0124-7107-reus-19-01-00102.pdf>

ISSN

2389-7066

ANEXOS

Anexo 1: Identificación taxonómica molecular de la *Kocuria rosea*



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO - 1912600 - LMT

SOLICITANTE: Jaime Luna Grandez
ENSAYO SOLICITADO: Identificación taxonómica molecular basada en espectrometría de masas MALDI-TOF

DESCRIPCION DEL OBJETO ENSAYADO

Procedencia: Lima
Tipo de muestra: Cepa bacteriana
Cantidad de muestra: 01 Cepa (600)
Tipo de envase: Placa Petri, no refrigerada
Estado y condición de la muestra: Se observó crecimiento confluyente en la placa.
Características de la Cepa: Coloración Rosada
Fecha de recepción: 10 de diciembre de 2019
Fecha de inicio del ensayo: 12 de diciembre de 2019
Fecha de término del ensayo: 18 de diciembre de 2019

RESULTADOS DEL ENSAYO

Se obtuvieron colonias aisladas y de un solo tipo morfológico después de dos repiques sucesivos.

La mejor coincidencia del espectro de masas de la cepa analizada fue con:

Cepa	Score*
<i>Kocuria rosea</i> IMET 11363T HKJ	2.56

* Score ≥ 2 indica identificación confiable a nivel de especie.

INTERPRETACION

La cepa 600 pertenece al género *Kocuria* y a la especie *Kocuria rosea*.

Método

Método extendido de transferencia directa (eDT) según Procedimiento Operativo Estandar de Bruker para el equipo MALDI Biotyper.

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.



La Molina, 18 de diciembre de 2019

DRA. DORIS ZUNIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 614 7800 anexo 274
E-mail: lmt@lamolina.edu.pe

LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA "MARINO TABUSSO"

(511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: lmt@lamolina.edu.pe
Apartado Postal 456 - Lima 12 - PERU

Anexo 2: Identificación taxonómica molecular de la *Pseudomona putida*



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO - 1912603 - LMT

SOLICITANTE: Jaime Luna Grandez

ENSAYO SOLICITADO: Identificación taxonómica molecular basada en espectrometría de masas MALDI-TOF

DESCRIPCION DEL OBJETO ENSAYADO

Procedencia: Lima
Tipo de muestra: Cepa bacteriana
Cantidad de muestra: 01 Cepa (603)
Tipo de envase: Placa Petri, no refrigerada
Estado y condición de la muestra: Se observó crecimiento confluyente en la placa.
Características de la Cepa: Coloración Blanco
Fecha de recepción: 10 de diciembre de 2019
Fecha de inicio del ensayo: 12 de diciembre de 2019
Fecha de término del ensayo: 18 de diciembre de 2019

RESULTADOS DEL ENSAYO

Se obtuvieron colonias aisladas y de un solo tipo morfológico después de dos repiques sucesivos.

La mejor coincidencia del espectro de masas de la cepa analizada fue con:

Cepa	Score*
<i>Pseudomona putida</i> DSM22348T	2.52

* Score ≥ 2 indica identificación confiable a nivel de especie.

INTERPRETACION

La cepa 603 pertenece al género *Pseudomona* y a la especie *Pseudomona putida*.

Método

Método extendido de transferencia directa (eDT) según Procedimiento Operativo Estandar de Bruker para el equipo MALDI Biotyper.

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

La Molina, 18 de diciembre de 2019


DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 614 7800 anexo 274

E-mail: lmt@iamolina.edu.pe



LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA "MARINO TABUSSO"

(511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: lmt@iamolina.edu.pe
Apartado Postal 456 - Lima 12 - PERU

Anexo 3: Identificación taxonómica molecular del *Planomicrobium okeanokoites*



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO - 1912601 - LMT

SOLICITANTE: Jaime Luna Grandez
ENSAYO SOLICITADO: Identificación taxonómica molecular basada en espectrometría de masas MALDI-TOF

DESCRIPCION DEL OBJETO ENSAYADO

Procedencia: Lima
Tipo de muestra: Cepa bacteriana
Cantidad de muestra: 01 Cepa (601)
Tipo de envase: Placa Petri, no refrigerada
Estado y condición de la muestra: Se observó crecimiento confluyente en la placa.
Características de la Cepa: Coloración Naranja
Fecha de recepción: 10 de diciembre de 2019
Fecha de inicio del ensayo: 12 de diciembre de 2019
Fecha de término del ensayo: 18 de diciembre de 2019

RESULTADOS DEL ENSAYO

Se obtuvieron colonias aisladas y de un solo tipo morfológico después de dos repiques sucesivos.

La mejor coincidencia del espectro de masas de la cepa analizada fue con:

Cepa	Score*
<i>Planomicrobium okeanokoites</i> CICC 23980	2.26

* Score ≥ 2 indica identificación confiable a nivel de especie.

INTERPRETACION

La cepa 601 pertenece al género *Planomicrobium* y a la especie *Planomicrobium okeanokoites*.

Método

Método extendido de transferencia directa (eDT) según Procedimiento Operativo Estandar de Bruker para el equipo MALDI Biotyper.

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 614 7800 anexo 274

E-mail: lmt@lamolina.edu.pe



La Molina, 18 de diciembre de 2019

LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA "MARINO TABUSSO"

(511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: lmt@lamolina.edu.pe
Apartado Postal 456 - Lima 12 - PERU

Anexo 3: Identificación taxonómica molecular del *Micrococcus luteus*



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO - 1912602 - LMT

SOLICITANTE: Jaime Luna Grandez

ENSAYO SOLICITADO: Identificación taxonómica molecular basada en espectrometría de masas MALDI-TOF

DESCRIPCION DEL OBJETO ENSAYADO

Procedencia: Lima
Tipo de muestra: Cepa bacteriana
Cantidad de muestra: 01 Cepa (602)
Tipo de envase: Placa Petri, no refrigerada
Estado y condición de la muestra: Se observó crecimiento confluyente en la placa.
Características de la Cepa: Coloración Amarillo
Fecha de recepción: 10 de diciembre de 2019
Fecha de inicio del ensayo: 12 de diciembre de 2019
Fecha de término del ensayo: 18 de diciembre de 2019

RESULTADOS DEL ENSAYO

Se obtuvieron colonias aisladas y de un solo tipo morfológico después de dos repiques sucesivos.

La mejor coincidencia del espectro de masas de la cepa analizada fue con:

Cepa	Score*
<i>Micrococcus luteus</i> IMET 11249 HKJ	2.77

* Score ≥ 2 indica identificación confiable a nivel de especie.

INTERPRETACION

La cepa 602 pertenece al género *Micrococcus* y puede ser referida como *Micrococcus* sp.

Método

Método extendido de transferencia directa (eDT) según Procedimiento Operativo Estandar de Bruker para el equipo MALDI Biotyper.

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

La Molina, 18 de diciembre de 2019

DRA. DORIS ZÚNIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 614 7800 anexo 274

E-mail: lmt@lamolina.edu.pe

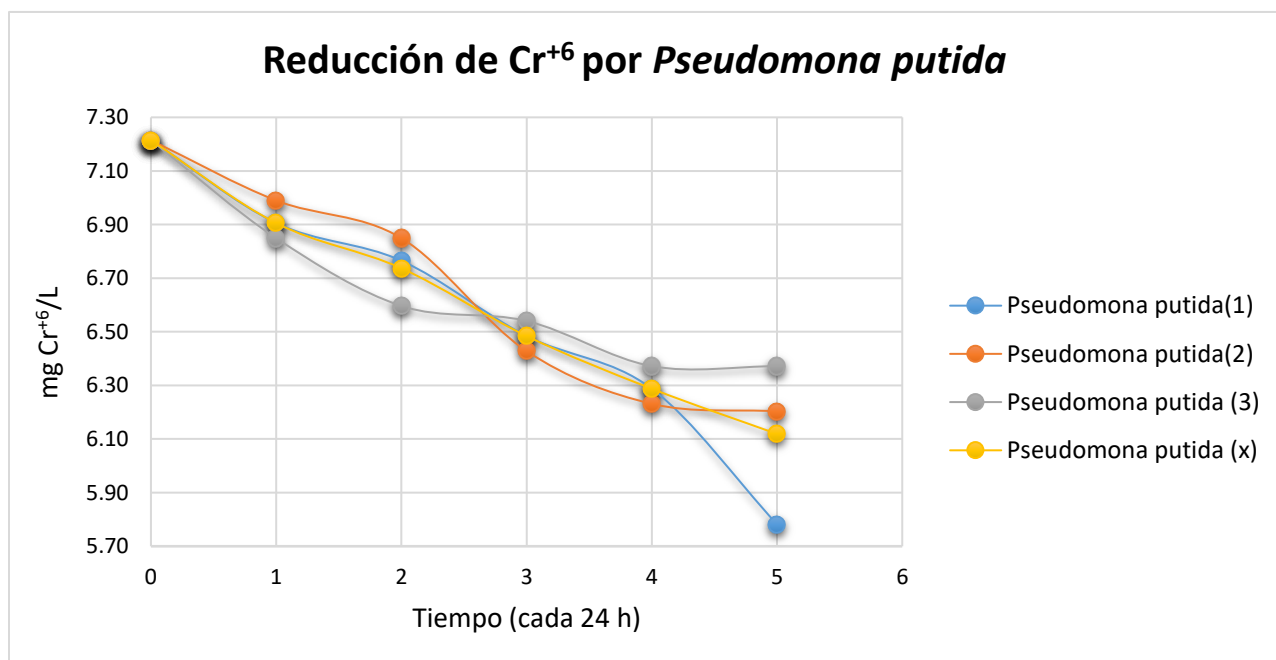


LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA "MARINO TABUSSO"

(511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: lmt@lamolina.edu.pe
Apartado Postal 456 - Lima 12 - PERU

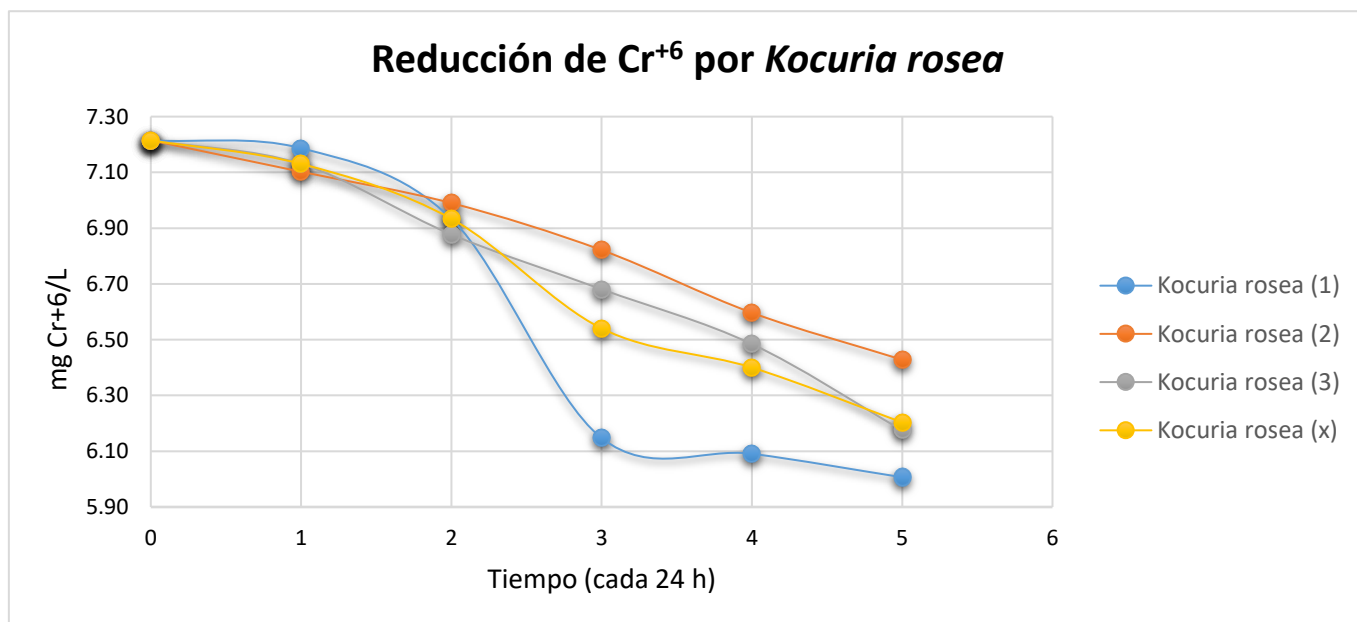
Anexo 5: Reducción de Cr⁶ por la *Pseudomona putida*

<i>Pseudomona putida</i> (1)			<i>Pseudomona putida</i> (2)			<i>Pseudomona putida</i> (3)			<i>Pseudomona putida</i> (x)		
Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%
0	7.2147	0	0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100
1	7.1866	0.39	1	7.1023	98.44	1	7.1304	98.83	1	7.1398	98.96
2	7.0461	2.34	2	6.9899	96.88	2	6.9338	96.11	2	6.9899	96.88
3	6.7652	6.23	3	6.8495	94.94	3	6.8776	95.33	3	6.8308	94.68
4	6.7090	7.01	4	6.6528	92.21	4	6.7933	94.16	4	6.7184	93.12
5	6.2033	14.02	5	6.3438	87.93	5	6.7933	94.16	5	6.4468	89.36
Reducción	1.0114	14.02	Reducción	0.8709	12.07	Reducción	0.4214	5.84	Reducción	1.1191	10.64



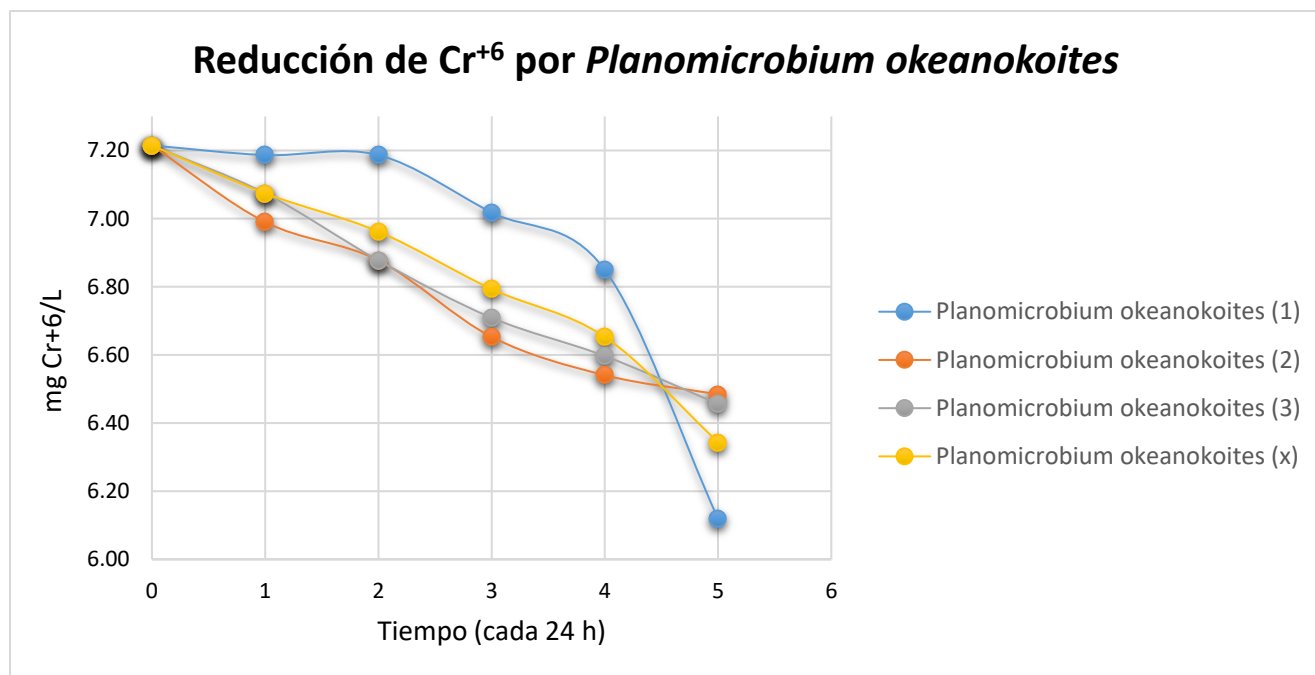
Anexo 6: Reducción de Cr⁶ por la *Kocuria rosea*

<i>Kocuria rosea</i> (1)			<i>Kocuria rosea</i> (2)			<i>Kocuria rosea</i> (3)			<i>Kocuria rosea</i> (x)		
Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%
0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100
1	6.7090	92.99	1	6.8214	94.55	1	6.6528	92.21	1	6.7277	93.25
2	6.4000	88.71	2	6.5966	91.43	2	6.4280	89.10	2	6.4749	89.75
3	5.8662	81.31	3	6.2595	86.76	3	6.2033	85.98	3	6.1097	84.68
4	5.7257	79.36	4	6.0909	84.42	4	6.0066	83.26	4	5.9411	82.35
5	5.5571	77.02	5	5.8100	80.53	5	5.6976	78.97	5	5.6882	78.84
Reducción	1.6576	22.98	Reducción	1.4047	19.47	Reducción	1.5171	21.03	Reducción	1.5265	21.16



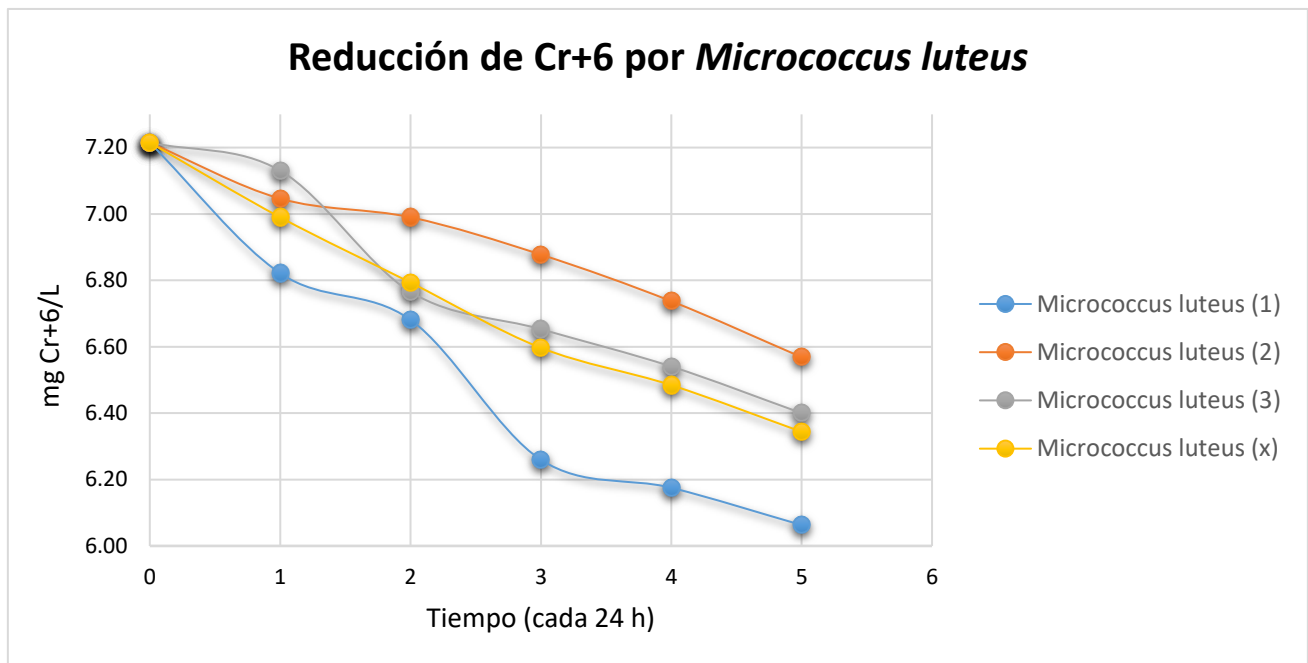
Anexo 7: Reducción de Cr⁶ por la *Planomicrobium okeanokoites*

<i>Planomicrobium okeanokoites</i> (1)			<i>Planomicrobium okeanokoites</i> (2)			<i>Planomicrobium okeanokoites</i> (3)			<i>Planomicrobium okeanokoites</i> (x)		
Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%
0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100
1	7.1866	99.61	1	6.9899	96.88	1	7.0742	98.05	1	7.0835	98.18
2	7.1866	99.61	2	6.8776	95.33	2	6.8776	95.33	2	6.9806	96.76
3	7.0180	97.27	3	6.6528	92.21	3	6.7090	92.99	3	6.7933	94.16
4	6.8495	94.94	4	6.5404	90.65	4	6.5966	91.43	4	6.6622	92.34
5	6.1190	84.81	5	6.4842	89.87	5	6.4561	89.49	5	6.3531	88.06
Reducción	1.0957	15.19	Reducción	0.7305	10.13	Reducción	0.7586	10.51	Reducción	0.8616	11.94



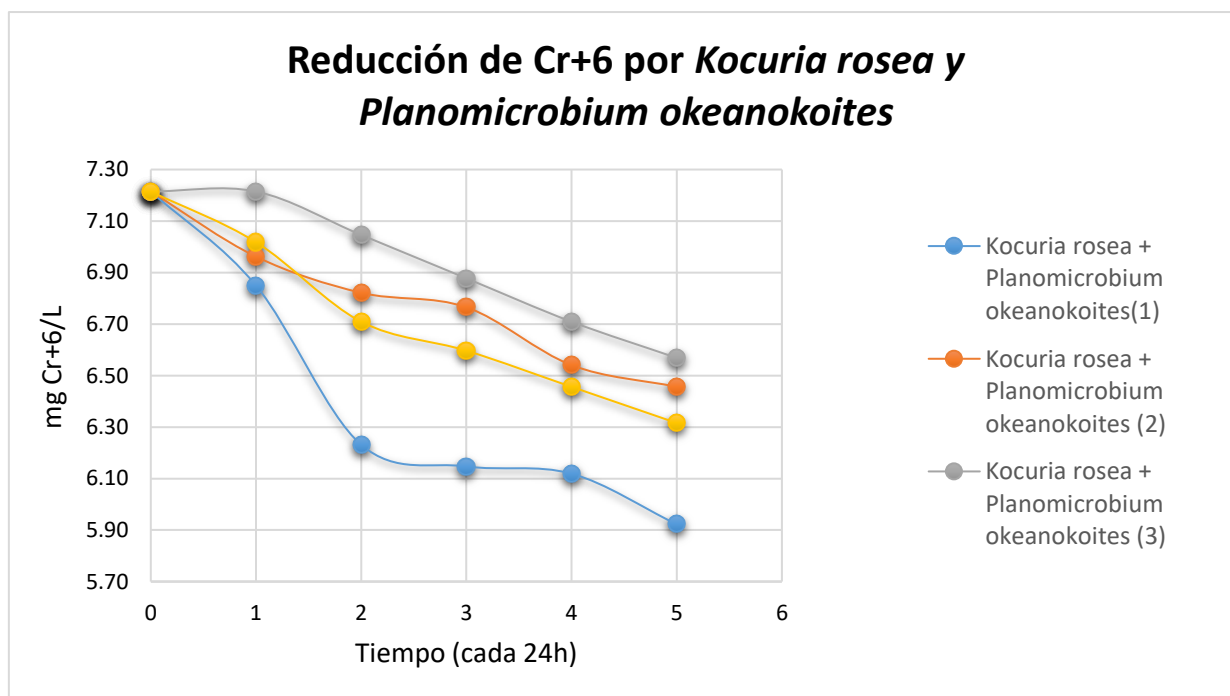
Anexo 8: Reducción de Cr⁶ por la *Micrococcus luteus*

<i>Micrococcus luteus</i> (1)			<i>Micrococcus luteus</i> (2)			<i>Micrococcus luteus</i> (3)			<i>Micrococcus luteus</i> (x)		
Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%
0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100
1	6.8214	94.56	1	7.0461	97.66	1	7.1304	98.83	1	6.9993	97.01
2	6.6809	92.60	2	6.9899	96.88	2	6.7652	93.77	2	6.8120	94.42
3	6.2595	86.76	3	6.8776	95.33	3	6.6528	92.21	3	6.5966	91.43
4	6.1752	85.59	4	6.7371	93.38	4	6.5404	90.65	4	6.4842	89.87
5	6.0628	84.03	5	6.5685	91.04	5	6.4000	88.71	5	6.3438	87.93
Reducción	1.1519	15.97	Reducción	0.6462	8.96	Reducción	0.8147	11.29	Reducción	0.8709	12.07



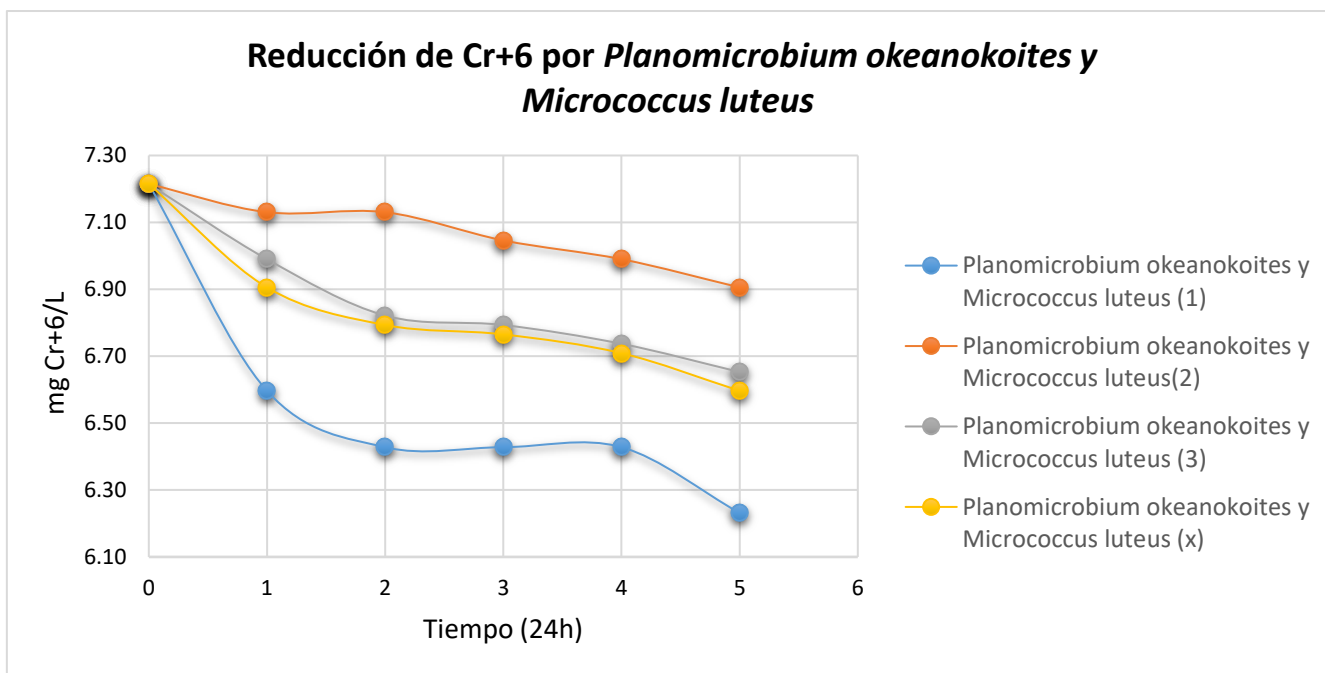
Anexo 9: Reducción de Cr⁶ por *Kocuria rosea* y *Planomicrobium okeanokoites*

<i>Kocuria rosea</i> + <i>Planomicrobium okeanokoites</i> (1)			<i>Kocuria rosea</i> + <i>Planomicrobium okeanokoites</i> (2)			<i>Kocuria rosea</i> + <i>Planomicrobium okeanokoites</i> (3)			<i>Kocuria rosea</i> + <i>Planomicrobium okeanokoites</i> (x)		
Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%	Tiempo	mg Cr ⁶ /L	%
0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100
1	6.8495	94.94	1	6.9618	96.49	1	7.2147	100	1	7.0087	97.14
2	6.2314	86.37	2	6.8214	94.55	2	7.0461	97.66	2	6.6996	92.86
3	6.1471	85.20	3	6.7652	93.77	3	6.8776	95.33	3	6.5966	91.43
4	6.1190	84.81	4	6.5404	90.65	4	6.7090	92.99	4	6.4561	89.49
5	5.9223	82.09	5	6.4561	89.49	5	6.5685	91.04	5	6.3156	87.54
Reducción	1.2924	17.91	Reducción	0.7586	10.51	Reducción	0.6462	8.96	Reducción	0.8991	12.46



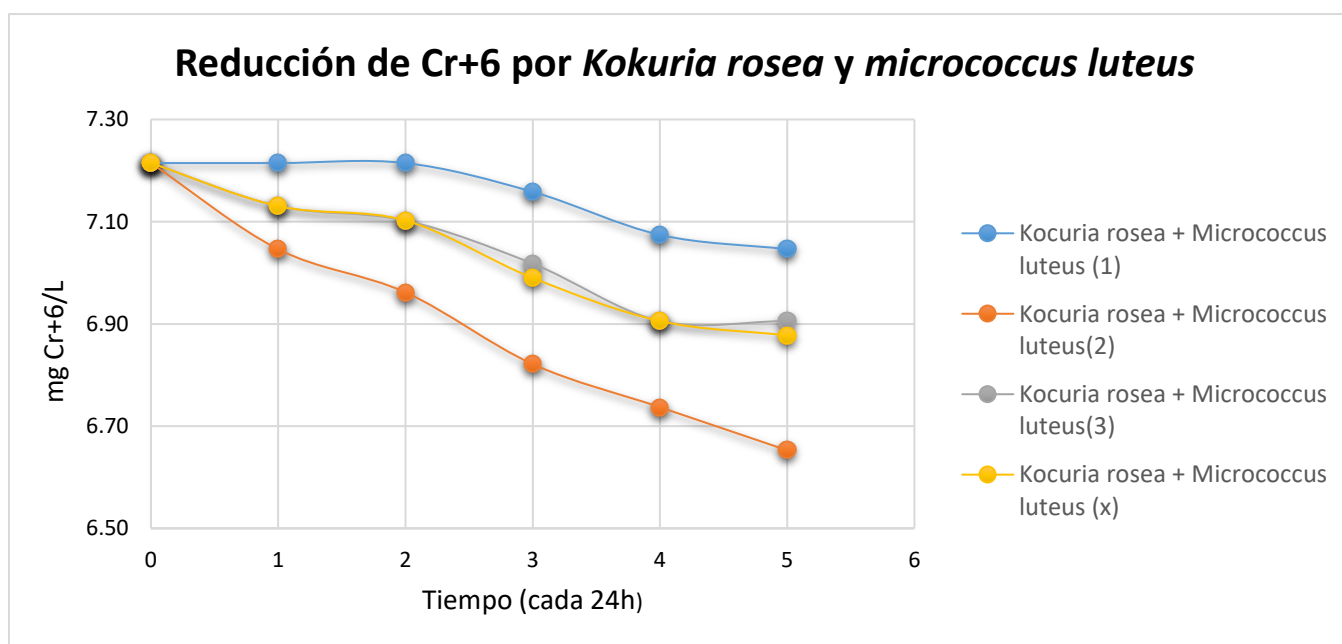
Anexo 10: Reducción de Cr⁶ por *Planomicrobium okeanokoites* y *Micrococcus luteus*

<i>Planomicrobium okeanokoites</i> + <i>Micrococcus luteus</i> (1)			<i>Planomicrobium okeanokoites</i> + <i>Micrococcus luteus</i> (3)			<i>Planomicrobium okeanokoites</i> + <i>Micrococcus luteus</i> (2)			<i>Planomicrobium okeanokoites</i> + <i>Micrococcus luteus</i> (x)		
Tiempo	mg Cr+6/L	%	Tiempo	mg Cr+6/L	%	Tiempo	mg Cr+6/L	%	Tiempo	mg Cr+6/L	%
0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100.00
1	6.5966	91.43	1	7.1304	98.83	1	6.9899	96.88	1	6.9056	95.72
2	6.4280	89.10	2	7.1304	98.83	2	6.8214	94.55	2	6.7933	94.16
3	6.4280	89.10	3	7.0461	97.66	3	6.7933	94.16	3	6.7558	93.64
4	6.4280	89.10	4	6.9899	96.88	4	6.7371	93.38	4	6.7183	93.12
5	6.2314	86.37	5	6.9057	95.72	5	6.6528	92.21	5	6.5966	91.43
Reducción	0.9833	13.63	Reducción	0.3090	4.28	Reducción	0.5619	7.79	Reducción	0.6181	8.57



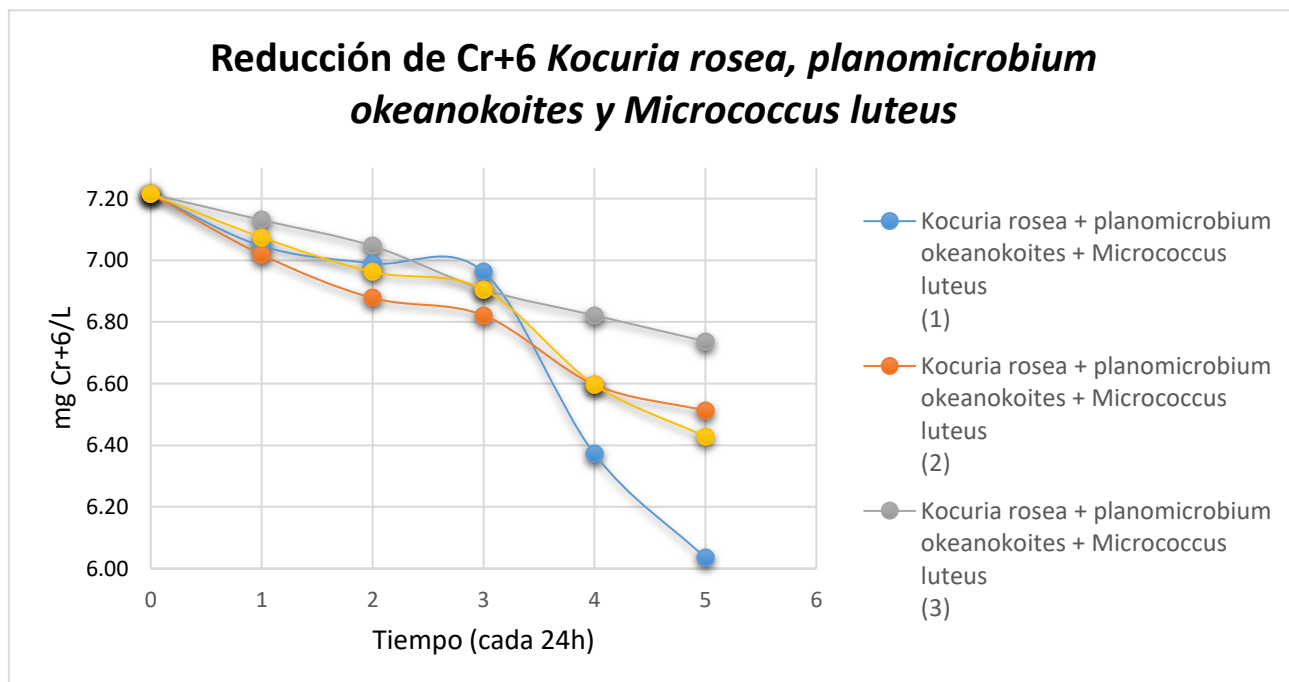
Anexo 11: Reducción de Cr⁶ por *Kokuria rosea* y *Micrococcus luteus*

<i>Kokuria rosea</i> + <i>micrococcus luteus</i> (1)			<i>Kokuria rosea</i> + <i>micrococcus luteus</i> (2)			<i>Kokuria rosea</i> + <i>micrococcus luteus</i> (3)			<i>Kokuria rosea</i> + <i>micrococcus luteus</i> (x)		
Tiempo	mg Cr+6/L	%	Tiempo	mg Cr+6/L	%	Tiempo	mg Cr+6/L	%	Tiempo	mg Cr+6/L	%
0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100
1	7.2147	100	1	7.0461	97.66	1	7.1304	98.83	1	7.1304	98.83
2	7.2147	100	2	6.9618	96.49	2	7.1023	98.44	2	7.0929	98.31
3	7.1585	99.22	3	6.8214	94.55	3	7.0180	97.27	3	6.9993	97.01
4	7.0742	98.05	4	6.7371	93.38	4	6.9057	95.72	4	6.9057	95.72
5	7.0461	97.66	5	6.6528	92.21	5	6.9057	95.72	5	6.8682	95.20
Reducción	0.1686	2.34	Reducción	0.5619	7.79	Reducción	0.309	4.28	Reducción	0.3465	4.8



Anexo 12: Reducción de Cr⁶ por *Kocuria rosea*, *planomicrobium okeanoikoites* y *Micrococcus luteus*.

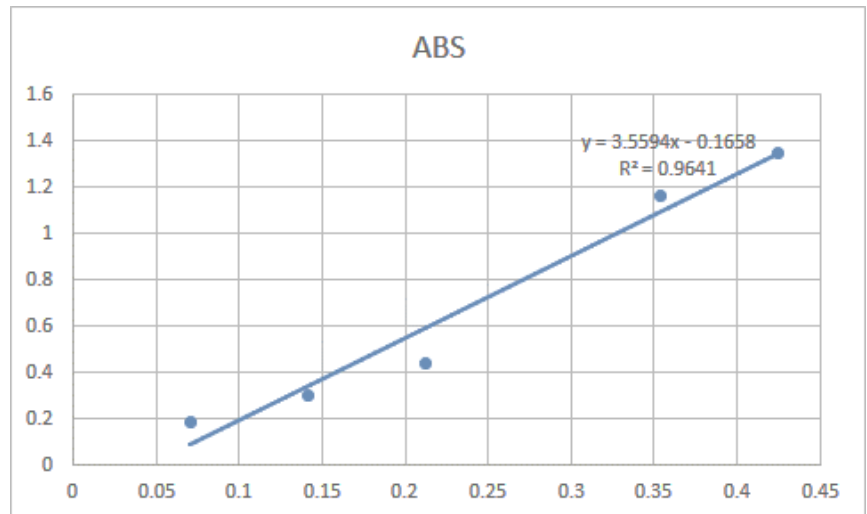
<i>Kocuria rosea</i> + <i>planomicrobium okeanoikoites</i> + <i>Micrococcus luteus</i> (1)			<i>Kocuria rosea</i> + <i>planomicrobium okeanoikoites</i> + <i>Micrococcus luteus</i> (2)			<i>Kocuria rosea</i> + <i>planomicrobium okeanoikoites</i> + <i>Micrococcus luteus</i> (3)			<i>Kocuria rosea</i> + <i>planomicrobium okeanoikoites</i> + <i>Micrococcus luteus</i> (x)		
Tiempo	mg Cr+6/L	%	Tiempo	mg Cr+6/L	%	Tiempo	mg Cr+6/L	%	Tiempo	mg Cr+6/L	%
0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100	0	7.2147	100
1	7.0461	97.66	1	7.0180	97.27	1	7.1304	98.83	1	7.0648	97.92
2	6.9899	96.88	2	6.8776	95.33	2	7.0461	97.66	2	6.9712	96.62
3	6.9618	96.49	3	6.8214	94.55	3	6.9057	95.72	3	6.9057	95.72
4	6.3719	88.32	4	6.5966	91.43	4	6.8214	94.55	4	6.5966	91.43
5	6.0347	83.64	5	6.5123	90.26	5	6.7371	93.38	5	6.4280	89.10
Reducción	1.18	16.36	Reducción	0.7024	9.74	Reducción	0.4776	6.62	Reducción	0.7867	10.90



Anexo 13: Tablas con valores de absorbancia y curva de calibración.

ABS	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Bo	0.091	0.08	0.075	0.065	0.058	0.04
Bo	0.091	0.083	0.078	0.063	0.056	0.055
Bo	0.091	0.078	0.069	0.067	0.061	0.061
B1	0.091	0.073	0.062	0.043	0.041	0.038
B1	0.091	0.077	0.069	0.057	0.051	0.041
B1	0.091	0.071	0.063	0.055	0.055	0.044
B2	0.091	0.09	0.09	0.084	0.078	0.052
B2	0.091	0.083	0.079	0.071	0.067	0.065
B2	0.091	0.086	0.079	0.073	0.069	0.064
B3	0.091	0.077	0.072	0.057	0.054	0.05
B3	0.091	0.085	0.083	0.079	0.074	0.068
B3	0.091	0.088	0.075	0.071	0.067	0.062
B1B2	0.091	0.078	0.056	0.053	0.052	0.045
B1B2	0.091	0.082	0.077	0.075	0.067	0.064
B1B2	0.091	0.091	0.085	0.079	0.073	0.068
B2B3	0.091	0.069	0.063	0.063	0.063	0.056
B2B3	0.091	0.088	0.088	0.085	0.083	0.08
B2B3	0.091	0.083	0.077	0.076	0.074	0.071
B1B3	0.091	0.091	0.091	0.089	0.086	0.085
B1B3	0.091	0.085	0.082	0.077	0.074	0.071
B1B3	0.091	0.088	0.087	0.084	0.08	0.08
B1B2B3	0.091	0.085	0.083	0.082	0.061	0.049
B1B2B3	0.091	0.084	0.079	0.077	0.069	0.066
B1B2B3	0.091	0.088	0.085	0.08	0.077	0.074

Cr+6 (mg/L)	ABS
0.0707	0.189
0.1414	0.304
0.2121	0.437
0.3535	1.167
0.4242	1.352



Anexo 13: Análisis estadísticos para el objetivo general y específico 1 (Determinar qué microorganismo nativo es eficiente frente a la *Pseudomona putida* y determinar la combinación de microorganismos nativos más eficiente frente a la *Pseudomona putida*, en la reducción de Cr⁺⁶)

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de ANOVA de un solo factor, para ello primero se validó el cumplimiento de los 3 supuestos requisitos:

- Tratamientos independientes
- Distribución normal
- Hocedasticidad

Tratamientos independientes

Los datos cumplen con este supuesto, ya que las pruebas realizadas (tratamientos), fueron de 8 tratamientos distintos (*Pseudomona putida*, *Kocuria rosea*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria rosea* + *Planomicrobium okeanokoites*, *Planomicrobium okeanokoites* + *Micrococcus luteus*, *Kocuria rosea* + *Micrococcus luteus*, y *Kocuria rosea* + *Planomicrobium okeanokoites* + *Micrococcus luteus*). Y ninguno de los tratamientos supedita a los otros.

Distribución normal

Para determinar la distribución de los datos, se empleó la prueba de Anderson Darlin en el Minitab 19 con el cual se constató si la distribución de los datos de los resultados de la reducción porcentual de Cr^{+6} era normal o no. Teniendo como hipótesis nula y alterna las siguientes:

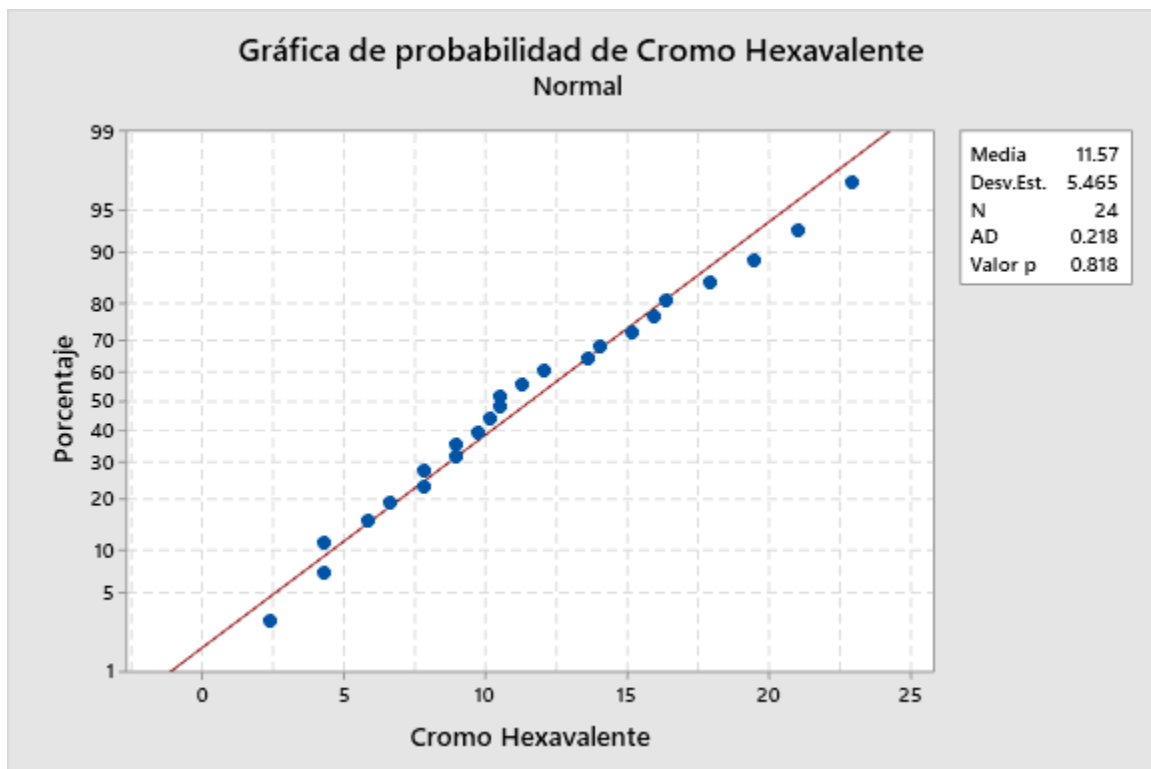
H_0 : Los datos tienen una distribución normal

H_a : Los datos no tienen una distribución normal

Si:

* El valor $p > 0.05$, se acepta la hipótesis nula.

* El valor $p < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.



Interpretación:

Se observa que el “valor p” obtenido es 0.818, dicho valor es mayor a 0.05 (nivel de significancia) por lo que se acepta hipótesis nula, concluyendo que los datos de la reducción de Cr^{+6} por efecto de las bacterias tienen una distribución normal. El gráfico presenta los valores de cada uno los datos, los cuales se ajustan adecuadamente a la recta, con lo que queda comprobado la distribución normal.

Homocedasticidad

Para determinar la homocedasticidad (igualdad de varianzas) de los datos, se empleó la prueba de Bartlett en el Minitab 19, con el cual se constató la homocedasticidad de los datos de los resultados de la reducción porcentual de Cr^{+6} . Teniendo como hipótesis nula y alterna las siguientes:

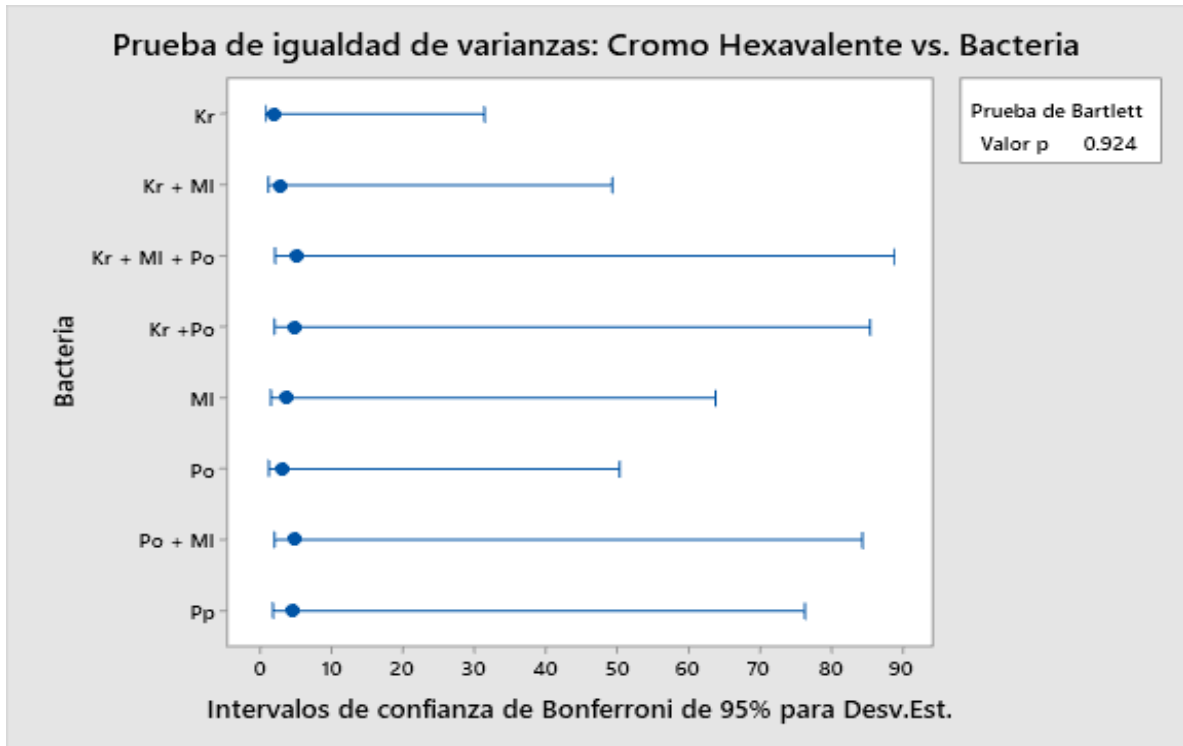
H_0 : Las varianzas son iguales

H_a : Por lo menos una varianza no es igual

Si:

* El valor $p > 0.05$, se acepta la hipótesis nula.

* El valor $p < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.



Interpretación:

Se observa que el “valor p” obtenido es 0.924, dicho valor es mayor a 0.05 (nivel de significancia) por lo que se acepta hipótesis nula, concluyendo que los datos de la reducción de Cr^{+6} son homocedásticos (tienen igualdad de varianzas). El gráfico representa la igualdad de las varianzas, los cuales se verifican en el traslape de cada una de las pruebas, con lo que queda comprobado la homogeneidad de las varianzas.

Anexo 14: Análisis estadísticos para el objetivo específico 2 (Influencia del tiempo en la reducción del Cr^{+6})

Tratamientos independientes

Los datos cumplen con este supuesto, ya que las pruebas realizadas (tratamientos), fueron de 8 tratamientos distintos (*Pseudomonas putida*, *Kocuria rosea*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria rosea* + *Planomicrobium okeanokoites*, *Planomicrobium okeanokoites* + *Micrococcus luteus*, *Kocuria rosea* +

Micrococcus luteus, y *Kocuria rosea* + *Planomicrobium okeanokoites* + *Micrococcus luteus*). Y ninguno de los tratamientos supedita a los otros.

Distribución normal

Para determinar la normalidad de la distribución de los datos, se empleó la prueba de Anderson Darlin en el Minitab 19 con el cual se constató si la distribución de los datos de los resultados de la reducción porcentual de Cr^{+6} por día era normal o no. Teniendo como hipótesis nula y alterna las siguientes:

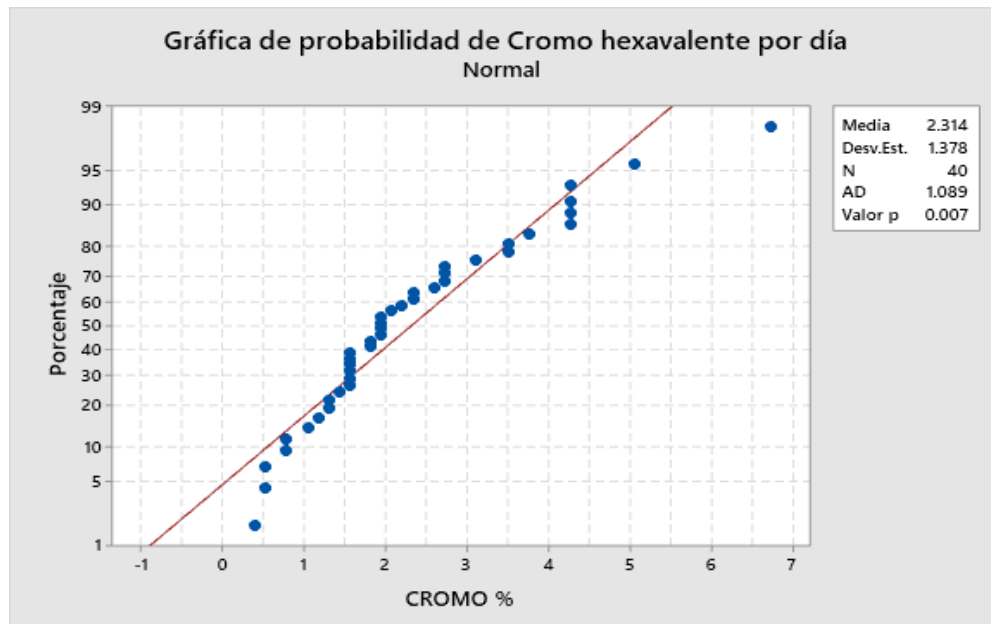
H_0 : Los datos tienen una distribución normal

H_a : Los datos no tienen una distribución normal

Si:

* El valor $p > 0.05$, se acepta la hipótesis nula.

* El valor $p < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.



Interpretación:

Se observa que el “valor p” obtenido es 0.007, dicho valor es menor a 0.05 (nivel de significancia) por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, concluyendo que los datos de la reducción de Cr^{+6} en el tiempo no tienen una distribución normal. El gráfico presenta los valores de cada uno los datos, los cuales no se ajustan adecuadamente a la recta.