



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

TEMA:

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA AL CR⁺⁶ DE LA BACTERIA
ANTÁRTICA *ACINETOBACTER JOHNSONII*

TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO
EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

AUTOR:

Diego Stalin Guerra Goyes

DIRECTORA:

Ing. Tania Elizabeth Oña Rocha MSc.

Ibarra, Ecuador 2025

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURLES RENOVABLES

**“ESTUDIO DE LA RESISTENCIA AL CR⁺⁶ DE LA BACTERIA
ANTÁRTICA *ACINETOBACTER JOHNSONII* “**

Trabajo de titulación revisada por el Comité Asesor, previa a la obtención del
Título de:

INGENIERO EN RECURSOS NATURLES RENOVABLES

APROBADA:

Ing. Tania Elizabeth Oña Rocha MSc.



DIRECTORA

FIRMA

Ing. Jimmy Núñez Msc.



ASESOR

FIRMA

IBARRA – ECUADOR

JULIO, 2025

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hacemos la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual ponemos a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO	
CÉDULA DE IDENTIDAD	0401831565
APELLIDOS Y NOMBRES	Guerra Goyes Diego Stalin
DIRECCIÓN:	Bolivar – Carchi
EMAIL:	diegostalin2001@gmail.com
TELÉFONO FIJO:	TELÉFONO MÓVIL: 0997553813

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	ESTUDIO DE LA RESISTENCIA AL CR ⁺⁶ DE LA BACTERIA ANTÁRTICA <i>ACINETOBACTER JOHNSONII</i>
AUTOR:	Guerra Goyes Diego Stalin
FECHA:	10 de julio de 2025
PROGRAMA:	PREGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniería en Recursos Naturales Renovables
DIRECTOR:	Ing. Tania Elizabeth Oña Rocha MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 11 días del mes de julio de 2025

EL AUTOR:

Firma 
Nombre: Guerra Goyes Diego Stalin
Ci.: 0401831565

Ci.: 0401831565
Nombre: Guerra Goyes Diego Stalin
Firma

EL AUTOR:

Ibarra, a los 11 días del mes de julio de 2025

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

2. CONSTANCIAS

REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

Guía: FICAYA-UTN

Fecha: 10 de julio del 2025

GUERRA GOYES DIEGO STALIN

**ESTUDIO DE LA RESISTENCIA AL CR⁺⁶ DE LA BACTERIA
ANTÁRTICA *ACINETOBACTER JOHNSONII***

TRABAJO DE GRADO

Ingeniero en Recursos Naturales Renovables, Universidad Técnica del Norte.
Carrera de Ingeniería en Recursos Naturales Renovables, Ibarra, 10 de julio de
2025.

DIRECTORA: Ing. Tania Elizabeth Oña Rocha MSc.

Ibarra, 10 de julio de 2025

AUTOR

.....


Guerra Goyes Diego Stalin

DIRECTORA

.....


Ing. Tania Elizabeth Oña Rocha MSc.

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por el señor GUERRA GOYES DIEGO STALIN, con cédula de identidad Nro. 0401831565, bajo mi supervisión en calidad de directora.



.....
Ing. Tania Elizabeth Oña Rocha MSc.

DIRECTORA

Ibarra a los 10 del mes de julio de 2025

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar un fuerte agradecimiento a la Ing. Tania Oña, MSc., por creer en mí, por ver ese potencial que tal vez no miraba, en ese muchacho curioso que quería aprender y devorar el mundo; por cada plática de ciencia, esos datos curiosos que compartimos sobre la investigación y esos valiosos consejos que llevaré, por su paciencia y compromiso, que me motivaron a seguir a pesar de que existen dificultades en el proceso.

Extiendo mi agradecimiento al Ing. Jimmy Núñez, MSc., por tener siempre esa paciencia de explicarme aquellas que no comprendía, las pláticas que fueron muy importantes para mejorar, y por esas alentadoras palabras : “Vas bien, sigue así”, que me motivaban aún más, aunque sentía que debía aprender mucho más; Y entender que podemos dar pequeños pasos y llegar a la meta.

A la Universidad Técnica del Norte, mi gratitud por brindarme las herramientas necesarias para formarme y ser capaz de generar soluciones como futuro profesional aportando a la sociedad.

De igual manera, agradecer al Laboratorio LABINAM, que me abriera sus puertas, y al equipo de investigadores; al Ing. Jonathan, por su exigencia que me enseñó a desenvolverme de una manera mejor el laboratorio, por enseñarme a no tener miedo de hacer esas preguntas tontas, todo es parte del aprendizaje. A perder ese miedo a equivocarse y empezar de nuevo sin temor.

También agradezco al Ing. Vanzety, quien me colaboro durante el desarrollo de mi tesis, con esa predisposición pendiente de mis avances y esas nuevas cosas descubría. A la Ing. Karen, por exigirme, sabiendo que era por ayudarme y confiar más en mí. A al Ing. Gualoto, MSc., por saber guiarme en un inicio del proyecto de tesis con las bases necesarias y no morir en el intento.

DEDICATORIA

Este logro se lo dedico a mis padres, con amor y gratitud: Patricia y Guillermo, quienes supieron aconsejarme, motivarme a seguir intentando, a no rendirme y a avanzar sin miedo. También a mis hermanos Fernando, Andrea, Daniel y Jessica, por su apoyo, por sus ocurrencias y por esos chistes sobre cuidar el planeta del “niño explorador”. Me siento muy satisfecho de haber compartido con ellos lo que aprendía en mi carrera, y que hoy puedan ver, desde otro punto de vista, la importancia de las plantas y los animalitos como seres fundamentales que cumplen un rol dentro de los ecosistemas.

A mis amigas Carolina, Sol, Karen, Soffia, Elsa y Jessi, que hicieron de estos años en la U un lugar bonito para compartir entre risas y tristezas, por aquellas ocurrencias y esa imaginación sin límites; por esas pláticas durante clase que nunca fueron descubiertas, por las escapadas solo porque hacía frío o porque hacer la fotosíntesis. Y a Diosito, por ponerme en el lugar y momento indicado, permitiéndome conocer a esas personas maravillosas en el proceso de mi vida universitaria, quienes fueron un curita para el alma cuando más lo necesitaba.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	Páginas
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Revisión de antecedentes	1
1.2 Problema de investigación y justificación.....	3
1.3 Objetivos	5
1.3.1. Objetivo General	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Preguntas directrices de la investigación	5
1.5 Hipótesis.....	5
CAPÍTULO II	6
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 El Cromo	6
2.1.1 Fuentes de Contaminación por Cromo Hexavalente.....	7
2.1.2 Naturales y Antropogénicas	7
2.2 Efectos tóxicos del Cr ⁺⁶	7
2.2.1. Bioacumulación en Ecosistemas Acuáticos y Terrestres	8
2.2.2. En la Salud Humana.....	8
8	
2.3 Género <i>Acinetobacter</i>	8
2.3.1 Potencial del género <i>Acinetobacter</i> en la biorremediación: Cr ⁺⁶	9
2.3.2 Bacteria <i>Acinetobacter jhonsonii</i>	9
2.4 Marco legal.....	10
2.4.1 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)	10
2.4.2 Constitución del Ecuador 2008	10
2.4.3 Código Orgánico del Ambiente (CODA)	11
2.4.4 Reglamento al código orgánico del ambiente (RCODA)	11

2.4.5 Ley Orgánica de Recursos Hídricos uso y Aprovechamiento del Agua	11
2.4.6 Tratado Unificado de Legislación Ambiental, TULSMA (acuerdo ministerial 097- A)	12
2.4.7 Plan de Desarrollo para el Nuevo Ecuador 2024-2025	13
CAPÍTULO III	14
3. METODOLOGÍA	14
3.1 Descripción del Área de Estudio	14
3.2 Metodología	15
3.2.1 Preparación de Muestra Madre	15
3.2.2 Determinación de la tasa de crecimiento bacteriano en LB	15
3.2.3 Conteo de colonias UFC	16
3.2.4 Preparación de Muestras Madre del Metal	17
3.2.5 Pruebas de Tolerancia con Cr ⁺⁶	18
3.2.6 Análisis Estadístico	19
3.2.6 Árbol filogenéticos	20
3.3 Materiales y equipos	21
CAPÍTULO IV	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 Cinética de crecimiento de <i>Acinetobacter johnsonii</i> en ausencia de cromo hexavalente	22
4.1.1 Tasa de crecimiento (UFC) en ausencia de cromo hexavalente	24
4.2 Cinética de crecimiento a 2000 ppm de cromo hexavalente	25
4.3 Cinética de crecimiento a 4000 ppm de cromo hexavalente	27
4.4 Cinética de crecimiento a 8000 ppm de cromo hexavalente	27
4.4.1 Tasa de crecimiento en función a la concentración de Cr	29
4.6 Mecanismos de tolerancia al cromo hexavalente	30
4.6 Cambios morfológicos como mecanismo de tolerancia	32
CAPÍTULO V	35
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
5.1 Conclusiones	35
5.2 Recomendaciones	35

REFERENCIAS.....	36
ANEXOS.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Valores máximos permisibles de Cr ⁺⁶ en recurso hídricos.....	12
Tabla 2 Valores máximos permisibles de Cr ⁺⁶ en suelo y remediación	13
Tabla 3 Materiales y equipos	21
Tabla 4 Análisis de Varianza	29
Tabla 5 Comparación de capacidades funcionales entre especies de Acinetobacter	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo del cromo en el ambiente.....	6
Figura 2 Mapa de Ubicación de la Estación Ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado.....	14
Figura 3 Preparación de muestras <i>A. johnsonii</i> y conservación BH1	15
Figura 4 Determinación de la tasa de crecimiento <i>A. johnsonii</i> en LB.....	16
Figura 5 Pruebas de tolerancia con Cr ⁺⁶	19
Figura 7 Curva de crecimiento <i>Acinetobacter johnsonii</i> en LB.....	23
Figura 8 Colonias de <i>Acinetobacter johnsonii</i> en medio sólido.....	25
Figura 9 Curva de tolerancia de <i>A. johnsonii</i> al Cr ⁺⁶	28
Figura 10 Colonias de <i>Acinetobacter johnsonii</i> a exposición de Cr ⁶	30
Figura 11 Árbol filogenético	31
Figura 12 Respuesta morfológica a la exposición de Cr ⁶⁺	33
Figura 13 Morfología de las colonias de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i> tras exposición a clorhexidina.	34

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó la resistencia de *Acinetobacter johnsonii* frente a la exposición de Cr⁶⁺ un contaminante muy tóxico presente en procesos industriales como la fabricación de tintes, cuero, pinturas y metales. Con el objeto de evaluar la resistencia de esta cepa a diferentes concentraciones del cromo hexavalente Se determinó la cinética de crecimiento de ésta en medio Luria-Bertani suplementado con 2000, 4000 y 8000 ppm de Cr⁶⁺ a 37 °C y con agitación orbital a 30 rpm. Mediante el seguimiento a través de densidad óptica (OD₆₀₀) y recuento de UFC a partir de tres réplicas por tratamiento. Conjuntamente, se construyó un árbol filogenético a partir de la secuencia del gen 16S rRNA para comparar la cepa aislada con otras especies del género *Acinetobacter*. Los resultados indicaron que toleró hasta 8000 ppm de Cr⁶⁺, a pesar de las diferencias significativas según ANOVA ($p < 0,001$) la bacteria alcanzó una densidad poblacional máxima de 27×10^6 UFC a 8000 ppm, con una tasa de crecimiento $k = 0,0174 \text{ h}^{-1}$. Además, se identificaron respuestas morfológicas en el conteo de UFC ante la exposición al metal, y el análisis filogenético del gen 16S rRNA mostró un >95% de similitudes con especies reductoras de Cr⁶⁺ sugiriendo la posible existencia de genes como el chrR que se han descrito implicados en la detoxificación del Cr⁶⁺. En conclusión, *Acinetobacter johnsonii* mostró una notable tolerancia al Cr⁶⁺, junto con características morfológicas y genéticas asociadas a la resistencia bacteriana, destacando su potencial.

Palabras clave: Cromo hexavalente, Resistencia bacteriana, Adaptación ambiental, Tolerancia microbiana, Estrés oxidativo, Cambios morfológicos.

ABSTRACT

In the present research work, the resistance of *Acinetobacter johnsonii* to Cr^{6+} , a highly toxic contaminant present in industrial processes such as the manufacture of dyes, leather, paints and metals, was evaluated. In order to evaluate the resistance of this strain to different concentrations of hexavalent chromium, its growth kinetics was determined in Luria-Bertani medium supplemented with 2000, 4000 and 8000 ppm Cr^{6+} at 37 °C and with orbital shaking at 30 rpm. By monitoring through optical density (OD_{600}) and CFU counts from three replicates per treatment. In conjunction, a phylogenetic tree was constructed from the 16S rRNA gene sequence to compare the isolated strain with other species of the genus *Acinetobacter*. The results indicated that it tolerated up to 8000 ppm Cr^{6+} , despite significant differences according to ANOVA ($p < 0.001$) the bacterium reached a maximum population density of 27×10^6 CFU at 8000 ppm, with a growth rate $k = 0.0174 \text{ h}^{-1}$. In addition, morphological responses in CFU count upon metal exposure were identified, and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene showed >95% similarity to Cr^{6+} -reducing species suggesting the possible existence of genes such as *chrR* that have been described to be involved in Cr^{6+} detoxification. In conclusion, *Acinetobacter johnsonii* showed remarkable tolerance to Cr^{6+} , along with morphological and genetic characteristics associated with bacterial resistance, highlighting its potential.

Keywords: Bacterial resistance, Bacterial resistance, Environmental adaptation, Microbial tolerance, Oxidative stress, Morphological changes, Hexavalent chromium.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Revisión de antecedentes

El cromo, es un metal de transición que forma parte del grupo VI, su nombre proviene del término del griego “chroma” que hace referencia al color, debido a la variedad de tonalidades que presentan sus compuestos. En la naturaleza, el cromo suele encontrarse en minerales, siendo la cromita uno de los más representativos. En su estado de oxidación Cr^{+6} , también llamado cromo hexavalente, se encuentra frecuentemente en residuos y contaminantes provenientes de procesos industriales. Lo que lo convierte en una preocupación significativa para la salud humana debido a su asociación con varios tipos de cáncer (Sathishkumar et al., 2017). Por otro lado, en su estado de Cr^{+3} denominado cromo trivalente menos nocivo. El cromo tiene diversas aplicaciones industriales, como tintes de textiles, curtido de cuero, fabricación de pinturas y pigmentos, así como en galvanoplastia y procesamiento de metales (metalurgia) (Essahale et al., 2012).

Por otro lado Ruesta y Salazar (2021) en la revisión sistemática tienen como objetivo comprender como estos microorganismos son capaces de bacterias reducir el Cr^{+6} de los efluentes de curtiduría. Este estudio consideró más de 40 artículos científicos en un periodo de doce años en el cual ha empleado la metodología PRISMA, que de tal manera ayuda es una forma sistemática de reportar con de una manera más claridad los diferentes métodos y hallazgos obtenidos en donde se evidenció que las bacterias aerobias son unas de las más utilizadas en el área y también se identificaron las condiciones óptimas en función a estos microorganismos. Además, cabe mencionar que la India y Pakistán lideran en la investigación en este campo. Según Islas y Bojórquez (2011) se han identificado diversas especies, como *Pseudomonas putida* MK1, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spp.* y *Staphylococcus cohnii*, que han sido encontradas en lugares donde hay contaminación por cromo hexavalente.

El género *Acinetobacter* sobresale por su adaptabilidad excepcional, prosperando en una amplia variedad de entornos, desde ambientes extremos como Antártida, deshielos, lagunas de gran altitud en los Andes argentinos, piscinas contaminadas, como zonas petroleras en la India, explotaciones de oro y aluminio en Eslovaquia, e incluso en aguas residuales procedentes de hospitales en China. Estas bacterias poseen notables propiedades biocatalíticas, que les permiten descomponer pesticidas, xenobióticos, petróleo, fosfatos, amoníaco y metales pesados (Montes-Robledo et al., 2024). Mostrando capacidad de supervivencia y en algunos casos, capacidad de biotransformación, biosorción y bioacumulación (Islas-Espinoza y Bojórquez-Aguilar, 2011).

Destacando el género por su capacidad para poder adaptarse a estos ambientes difíciles y realizar procesos de detoxificación. Por ejemplo, mencionar la bacteria MA19 degrada el malatión en aguas residuales (Xie et al., 2009), mientras que la cepa F elimina amonio, nitrito y nitrato en las aguas residuales (Zhong et al., 2023). Por otro lado, la cepa b2w, tiene la capacidad biotransformar y acumular cromo (Sevak et al., 2023). Y la especie *Acinetobacter sp.* (ADHR1) de igual manera de convertir cromo Cr^{6+} a Cr^{3+} como potencial para estos procesos de biorremediación ambiental (Montes-Robledo et al., 2024).

Finalmente, la cepa de *Acinetobacter johnsonii*, recolectada durante la XVII Expedición Antártica de 2012 en la Estación Pedro Vicente Maldonado en Isla Greenwich, fue identificada en la Universidad Técnica del Norte dentro de un estudio que determinó su capacidad de degradación del polietileno, mostrando resultados prometedores (Pazos, 2022). Además, es uno de los primeros reportes de esta bacteria en el continente antártico. Varios estudios han identificado un potencial y la capacidad de biorremediación, sugiriendo su posible capacidad como biorremediador del cromo hexavalente (Montes-Robledo et al., 2024; Sevak et al., 2023a; Xie et al., 2009; Zhong et al., 2023).

1.2 Problema de investigación y justificación

La liberación de metales pesados por factores biológicos y ambientales puede propiciar su incorporación en las cadenas alimentarias, lo que desencadena problemas de bioacumulación y biomagnificación (Jaiswal et al., 2018). Este fenómeno, originado por actividades industriales y antropogénicas como la minería, metalurgia, industria química, agricultura, vertidos urbanos, residuos sólidos y emisiones vehiculares, provoca contaminación del suelo y del agua a nivel mundial (Abdallah, 2023; Wang et al., 2019). La superación de los límites seguros establecidos por la normativa (Wang et al., 2019) esta contaminación en un riesgo para la salud pública y al ambiente, afectando la sostenibilidad del entorno y la salud humana (Alengebawy et al., 2021; Briffa et al., 2020).

Estudios recientes realizados partir de núcleos de hielo antárticos indican una preocupante problemática de metales pesados como por ejempló, Pb, Cd, Tl, Bi, Ce que principalmente su origen tendría relación a las actividades antropogénicas principalmente la minera y metalúrgica en América del Sur y Australia entre el siglo XVIII, transportadas por los vientos estratosféricos y troposféricos medidos en Law Dome y Costs land provienetes de las fundiconsde Broken Hill y Porta pirie en Australia (McConnell et al., 2023). Enfatizando la importancia de porque implementar ciertas estrategias de biorremediación serían más beneficiosas por lo que enfatizan el rol ciertos microorganismos capaces de biorremediar metales pesados, de tal manera ofreciendo alternativas para abordar este problema (Verma y Kuila, 2019).

Con efectos negativos como son la degradación de la calidad de los recursos tanto agua y suelo, comprometiendo la seguridad alimentaria y la salud de los individuos a largo plazo (Abdallah, 2023). Y a pesar de la magnitud del problema, también la falta de infraestructuras adecuadas y estudios de procesos de biorremediación suficientes se ve limitada la capacidad de una tratamiento más efectivo y económico al mismo tiempo, lo que hace aún más la situación sus impactos negativos a largo plazo (Biswas et al., 2021). Por ello la importancia de implementar estrategias

globales de mitigación de manera integral, y con el objetivo de poder salvaguardar tanto la salud humana como el equilibrio del ambiente.

Los sistemas convencionales de tratamiento de metales pesados conllevan costos significativos y pueden incluso contribuir a una mayor contaminación secundaria, lo que agrava el problema existente (Abdallah, 2023). En contraste, la aplicación de microorganismos para la biorremediación ofrece una solución más económica y potencialmente más efectiva en comparación con las técnicas tradicionales. Por ello este enfoque podría significar una reducción considerable en los costos asociados con la mitigación y gestión de la contaminación, al mismo tiempo que ofrece una alternativa más sostenible y menos intrusiva (Biswas et al., 2021).

Los metales pesados en lo que respecta al ambiente son una de las amenazas con más efectos negativos para tanto los ecosistemas terrestres y los acuáticos, más aún se podría decir especialmente en entornos mucho más sensibles como la Antártida (McConnell et al., 2023). En este contexto la importancia de la presencia de estos microorganismos que son capaces de tolerar y más aún degradar ciertos metales pesados abre una puerta que ofrece una alternativa sostenible y tal manera al mismo tiempo efectiva para recuperar los suelos y aguas contaminadas, y así poder dar una conservación más sostenible estos ecosistemas mencionar a los páramos altoandinos y las zonas polares (Biswas et al., 2021). Además, este proyecto se ajusta con los Objetivos de Desarrollo Sostenible 6 (Agua limpia y saneamiento) y el 15 (Vida de ecosistemas terrestres), de esta forma se da paso a más soluciones innovadoras para la purificación y descontaminación de aguas y suelos (Naciones Unidas, 2018).

El proyecto parte de la “Evaluación de la tolerancia a cobre, potasio, cromo, plomo, cadmio, zinc de la cepa bacteriana antártica *Acinetobacter johnsonii*” la cual se enfoca en ver la interacción de capa con metales pesados más problemáticos y posibles soluciones. Este trabajo también se respalda con convenios con la Dirección General de Intereses Marítimos DIGEIM, la Universidad Técnica del

Norte y el Instituto Oceanográfico y Antártico de la Armada INOCAR, lo cual fortalecer la investigación en la región antártica con el objetivo de generar investigación.

1.3 Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Evaluar la tolerancia de la bacteria antártica *Acinetobacter johnsonii* al cromo hexavalente en condiciones de laboratorio.

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la cinética de crecimiento de *Acinetobacter johnsonii* utilizando espectrofotometría y UFC como método de seguimiento.
- Determinar la cinética a varias concentraciones del cromo hexavalente de *Acinetobacter johnsonii* mediante espectrofotometría y UFC.
- Análisis de los mecanismos tolerancia de *Acinetobacter johnsonii* a diferentes concentraciones de cromo hexavalente.

1.4 Preguntas directrices de la investigación

¿Cuáles son los niveles de tolerancia de *Acinetobacter johnsonii* ante el cromo hexavalente?

¿Cuáles es la cinética de crecimiento *Acinetobacter johnsonii* ante las diferentes concentraciones de cromo hexavalente?

1.5 Hipótesis

La bacteria antártica es capaz de tolerar el cromo hexavalente mediante análisis de la tasa de crecimiento, UFC y la espectrofotometría como método de evaluación.

CAPÍTULO II

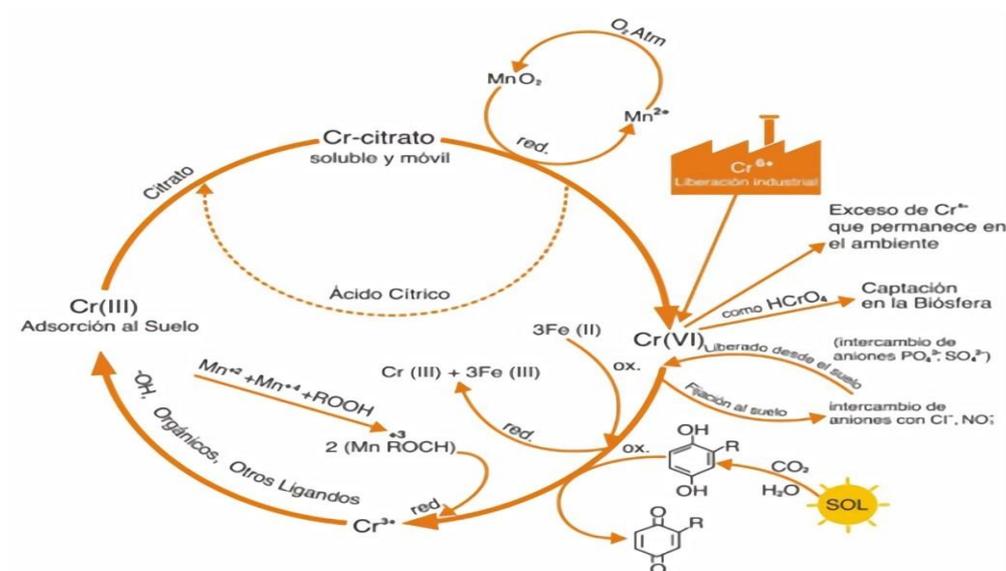
2. MARCO TEÓRICO

2.1 El Cromo

El cromo, un elemento metálico de transición con número atómico 24, presenta una variedad significativa de propiedades químicas. Se encuentran en varios estados de oxidación (Figura 1), como Cr^{+2} , Cr^{+3} y Cr^{+6} (Gupta y Rastogi, 2009). Particularmente, los compuestos de cromo hexavalente son particularmente conocidos por sus propiedades ácidas y oxidantes, lo que los convierte en componentes valiosos en diversas aplicaciones industriales, como la producción de pigmentos, el proceso de curtido de cuero y el tratamiento de superficies metálicas (Téllez et al., 2004). Descubierta por Louis Nicolás Vauquelin en 1797, quien produjo óxido de cromo (VI) al mezclar crocoíta con ácido clorhídrico, el cromo metálico fue aislado al año siguiente al calentar el óxido en un horno de carbón vegetal (Eggs, 2017).

Figura 1

Ciclo del cromo en el ambiente



Nota. Tomada de “Ciclo del cromo en el ambiente”, de N. Eggs, 2017

2.1.1 Fuentes de Contaminación por Cromo Hexavalente

El cromo se encuentra naturalmente en varias formas y puede ser liberado al medio ambiente tanto por procesos naturales como antropogénicos. Las fuentes antropogénicas, como la fabricación de acero inoxidable, la producción de pigmentos y colorantes, el curtido de cuero y la preservación de madera, son responsables de la generación de cromo hexavalente Cr^{+6} que contamina el aire, el agua y el suelo. Además, el cromo metálico Cr^0 se utiliza en la fabricación de acero, mientras que las formas trivalentes predominan en seres vivos (Antolinez et al., 2020).

2.1.2 Naturales y Antropogénicas

El cromo se presenta en la naturaleza en distintas formas y puede ser liberado al medio ambiente en procesos geológicos naturales, como la erosión de rocas que contienen cromo. Sus fuentes naturales son los depósitos minerales y la actividad volcánica. El agua y el suelo el cromo se puede encontrar por medio de estos procesos naturales y en cuanto a concentraciones se refiere puede estar presente en pequeñas cantidades (Piedad et al., 2010). Por otro lado, su origen es a causa de actividades humanas como la elaboración de aceros inoxidable, la obtención de colorantes y pigmentos, el curtido de pieles y la preservación de la madera (Soni et al., 2013) que liberan Cr^{+6} al medio, contaminando el aire, el agua y el suelo. En adición, el cromo metálico Cr^0 es utilizado en la fundición de acero y las formas trivalentes se muestran más frecuentes en los organismos vivo (Piedad et al., 2010).

2.2 Efectos tóxicos del Cr^{+6}

El cromo hexavalente Cr^{+6} es muy tóxico y representa un riesgo para la salud humana y el medio ambiente, debido a su persistencia en el medio. El cromo hexavalente es un fuerte oxidante y muy soluble, lo que le permite atravesar fácilmente las membranas biológicas y tener efectos de carácter dañino en los

ecosistemas y en la salud humana (Eggs, 2017). Sus efectos causan preocupación en los ecosistemas y la salud humana, dado que es un compuesto muy tóxico y persistente en el medio (Téllez et al., 2004).

2.2.1. Bioacumulación en Ecosistemas Acuáticos y Terrestres

El Cr⁺⁶ es altamente tóxico para la vida acuática y terrestre, lo que afecta negativamente la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas. La bioacumulación y biomagnificación de Cr⁺⁶ a través de las cadenas alimentarias pueden llevar a niveles tóxicos en organismos superiores, incluyendo aves y mamíferos, lo que afecta su reproducción, crecimiento y comportamiento (Jaiswal et al., 2018). La persistencia y movilidad de Cr⁺⁶ en el ambiente aumentan su potencial de causar daño en los ecosistemas acuáticos y terrestres, aumentando los riesgos para la biodiversidad (Soni et al., 2013).

2.2.2. En la Salud Humana

Los efectos del cromo en la salud humana dependen de diversos factores, como la cantidad, duración y tipo de exposición, además de la interacción con otras sustancias químicas y las características individuales de la persona expuesta, como edad, sexo, dieta, estilo de vida y estado de salud. Los trabajadores expuestos al cromo pueden experimentar problemas respiratorios, irritación del revestimiento nasal y alergias cutáneas, entre otros efectos (ATSDR, 2012). La exposición crónica al Cr⁺⁶ puede llevar a enfermedades graves como cáncer de pulmón, problemas renales y hepáticos, y daños en el sistema inmunológico (Eggs, 2017).

2.3 Género *Acinetobacter*

Las bacterias del género *Acinetobacter*, pertenecientes a la familia Moraxellaceae, se caracterizan por su morfología gramnegativa, cocobacilo, no móvil y aerobia facultativa, lo que les confiere una alta adaptabilidad a diversas condiciones ambientales y las convierte en candidatas prometedoras para

aplicaciones de biorremediación (Montes-Robledo et al., 2024). La Antártida, un entorno extremo y prístino, alberga una diversidad única de microorganismos adaptados a condiciones ambientales rigurosas. Entre estos microorganismos, se destacan ciertas especies del género *Acinetobacter* por su potencial en aplicaciones biotecnológicas, incluida la biorremediación de contaminantes ambientales, como el cromo hexavalente Cr^{+6} (Montes-Robledo et al., 2024).

2.3.1 Potencial del género *Acinetobacter* en la biorremediación: Cr^{+6}

Acinetobacter johnsonii ha sido estudiada en el contexto de la biorremediación de contaminantes, aunque no se ha documentado su capacidad específica para degradar el cromo hexavalente Cr^{+6} . Sin embargo, investigaciones han demostrado que otras cepas del género *Acinetobacter*, han demostrado esta capacidad. *Acinetobacter baumannii*, por ejemplo, puede reducir el Cr^{+6} a Cr^{+3} con una tasa de biorreducción de hasta el 99% bajo condiciones óptimas (Sathishkumar et al., 2017). Además, *Acinetobacter sp.* (ADHR1) ha mostrado reducir hasta el 100% del Cr^{+6} en 18 a 24 horas, confirmando la presencia de la enzima cromato reductasa (Montes-Robledo et al., 2024). En contexto, *Acinetobacter junii* también destacando su capacidad para acumular y biotransformar este contaminante (Sevak et al., 2023).

2.3.2 Bacteria *Acinetobacter jhonsonii*

La cepa MA19 ha demostrado su capacidad para degradar el malatión en aguas residuales (Xie et al., 2009). Igualmente, LXL_C1 puede degradar ciprodinilo (Wang et al., 2019), y la cepa F elimina amonio, nitrito y nitrato, destacando su versatilidad en la biorremediación de diferentes contaminantes (Zhong et al., 2023). También se ha reportado puede degradar compuestos aromáticos como la naftalina, el antraceno y el pireno (Jiang et al., 2012; Jiang et al., 2018). Además, la cepa MJ4 es capaz de degradar más del 90% del gasóleo (diésel) con una concentración inicial de 20,000 mg/l después de 7 días de incubación, con la degradación más significativa ocurriendo durante los primeros 3

días en suelos afectados por derrames de petróleo en Daejeon, Corea del Sur (Lee et al., 2012). Estudios recientes han identificado que la cepa recolectada en expediciones antárticas tiene la capacidad de degradar polietileno, sugiriendo un potencial interés en su aplicación para la biorremediación de suelos y aguas contaminadas en entornos polares como la Antártida (Pazos, 2022).

2.4 Marco legal

2.4.1 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

El presente estudio está vinculado a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) propuestos en la Agenda 2030 de las Naciones Unidas, en particular al ODS 6, que incentiva el acceso al agua limpia y al saneamiento, y al ODS 15, orientado a la preservación de los ecosistemas terrestres. Estas metas subrayan la necesidad de desarrollar alternativas eficaces para la descontaminación y purificación de suelos y aguas, promoviendo una gestión responsable de los recursos naturales y asegurando la protección de la biodiversidad suelos (Naciones Unidas, 2018).

2.4.2 Constitución del Ecuador 2008

Este estudio se enmarca en las normativas legales vigentes en Ecuador. Desde el año 2008, la Constitución de la República del Ecuador reconoce a la La Naturaleza como un sujeto de derechos. Estas leyes impulsan la conservación y recuperación del medio ambiente, fomentando un uso responsable y equilibrado de los recursos, tanto renovables como no renovables (Asamblea Nacional, 2008):

En referencia al **Art 14** de la constitución, establece el derecho a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado.

El **Art 32** declara que la salud es un derecho que el estado debe garantizar mediante políticas ambientales.

El **Art 395** establece el principio de precaución en materia ambiental, obligando al estado a adoptar medidas preventivas y restrictivas en caso de riesgo de daño grave al medio ambiente.

2.4.3 Código Orgánico del Ambiente (CODA)

El libro tercero de la calidad ambiental, título V de gestión integral de residuos y desechos capítulo I disposiciones generales en el **Art 225** menciona sobre el fomento de la investigación, el desarrollo y la implementación de las mejores tecnologías disponibles para reducir los impactos ambientales y proteger la salud humana (Ministerio del Ambiente, 2017).

2.4.4 Reglamento al código orgánico del ambiente (RCODA)

La Autoridad Ambiental Nacional, junto con el ente rector del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología, Innovación y Saberes Ancestrales, desarrollará y actualizará los Lineamientos Estratégicos Nacionales de Investigación Ambiental. Estos lineamientos, detallados en el **Art 29**, se enfocan en fortalecer la coordinación entre las instituciones que llevan a cabo investigación ambiental y en fomentar el desarrollo del conocimiento relacionado con la temática ambiental en Ecuador (Ministerio del Ambiente, 2019).

2.4.5 Ley Orgánica de Recursos Hídricos uso y Aprovechamiento del Agua

En la Sección Segunda se detallan los objetivos de Prevención y Control de la Contaminación del Agua. En el **Artículo 79** se establece que la autoridad única del recurso hídrico siendo esta la autoridad ambiental nacional y más los gobiernos autónomos descentralizados deben colaborar para lograr los siguientes propósitos (Asamblea Nacional, 2014):

a) Garantizar el acceso al agua como un derecho humano fundamental para el bienestar, los derechos a la naturaleza, preservación de todas las formas de vida en un entorno saludable, ecológicamente equilibrado y libre de contaminación.

b) Proteger la cantidad y mejorar la calidad del agua.

c) Regular y prevenir la acumulación de sustancias tóxicas, desechos, vertidos y otros elementos contaminantes en el suelo y subsuelo que puedan afectar las aguas superficiales o subterráneas.

d) Supervisar las actividades que puedan causar daño al agua y a los ecosistemas acuáticos y terrestres relacionados, y asegurar la restauración de aquellos que estén degradados.

e) Prevenir la degradación de los ecosistemas asociados al ciclo hidrológico.

2.4.6 Tratado Unificado de Legislación Ambiental, TULSMA (acuerdo ministerial 097- A)

El Registro Oficial N°387 del 04 de noviembre de 2015, que actualmente se encuentra en vigor, incluye la emisión de los apéndices del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio, que son los siguientes:

Tabla 1

Valores máximos permisibles de Cr⁺⁶ en recurso hídricos

Tablas	Parámetros	Unidad	Límite máximo permisible
Criterios de calidad de fuentes de agua para consumo humano y doméstico (Tabla 1)	Cromo hexavalente	mg/l	0.05
Límites de descarga al sistema de alcantarillado público (Tabla 8)	Cromo hexavalente	mg/l	0.5
Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce (Tabla 9)	Cromo hexavalente	mg/l	0.5
Límites de descarga a un cuerpo de agua marina (Tabla 10)	Cromo hexavalente	mg/l	0.5

Nota. Límites máximos permisibles de la calidad ambiental y descarga de efluentes para el recurso agua (Anexo 1).

Tabla 2*Valores máximos permisibles de Cr⁺⁶ en suelo y remediación*

Parámetro	Unidades*	USO DEL SUELO			
		Residencial	Comercial	Industrial	Agrícola
Parámetros Inorgánicos					
Cromo Total	mg/kg	64	87	87	65
Cromo VI	mg/kg	0.4	1.4	1.4	0.4

Nota. Límites máximos permisibles de la calidad ambiental del recurso suelo y los criterios de remediación para suelos contaminados (Anexo 2).

2.4.7 Plan de Desarrollo para el Nuevo Ecuador 2024-2025

El Objetivo 7 del Plan de Desarrollo para el Nuevo Ecuador 2024-2025 busca precautelar el uso responsable de los recursos naturales dentro de un entorno ambientalmente sostenible. La Política 7.4 se centra en la conservación y restauración de los recursos naturales renovables, tanto terrestres como marinos, promoviendo modelos de desarrollo sostenibles, de bajas emisiones y resilientes a los efectos adversos del cambio climático (Secretaría Nacional de Planificación, 2024).

CAPÍTULO III

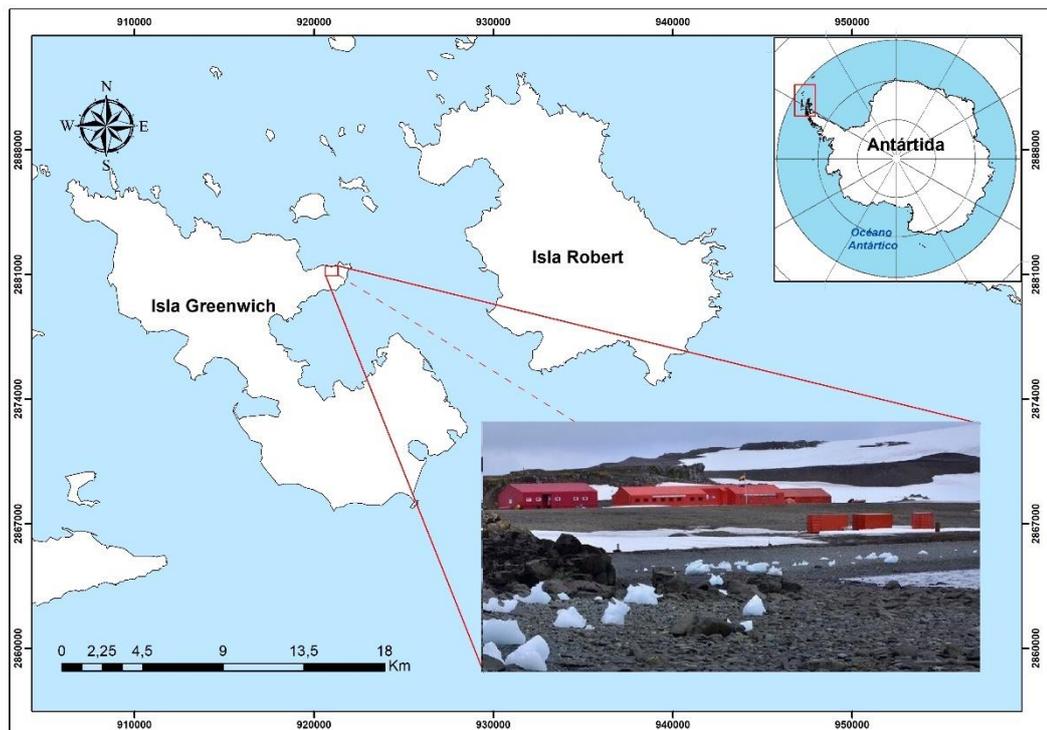
3. METODOLOGÍA

3.1 Descripción del Área de Estudio

Las muestras originales de suelo fueron recolectadas durante la XVII Expedición Antártica de 2012, en la estación ecuatorial Pedro Vicente Maldonado (Figura 2). Este trabajo dio continuidad a la investigación sobre la bacteria antártica, la cual fue identificada y se dispone de una muestra pura (Pazos, 2022). El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales (LABINAM), ubicado en el campus San Vicente de Paúl de la Universidad Técnica del Norte.

Figura 2

Mapa de Ubicación de la Estación Ecuatorial Pedro Vicente Maldonado



Nota. Datos de la costa antártica tomados de SCAR Antarctic Digital Database, 2024 (Gerrish et al., 2024). Imagen de la estación Ecuatorial Pedro Vicente Maldonado de Instituto Oceanográfico y Antártico de la Armada (Ecuador) (Sanchis, 2021).

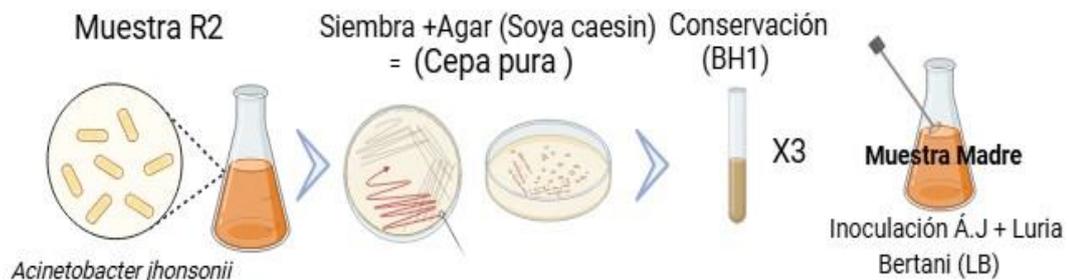
3.2 Metodología

3.2.1 Preparación de Muestra Madre

De acuerdo con la literatura, se recomendó la siembra en agar (Soya Casein Digest) según la especie estudiada (BacDive, 2023) . Se utilizó una muestra de la colonia, y se inoculó en un medio sólido de agar nutritivo mediante la técnica de agotamiento con cotonete. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas para permitir el crecimiento bacteriano (Sathishkumar et al., 2017). Posteriormente, se verificó la uniformidad de las colonias mediante exámenes visuales y microscópicos para detectar posibles contaminaciones. Una vez verificada la pureza de las colonias, se transfirieron una colonia de la cepa de *A. johnsonii* a un frasco con 100 ml de medio Luria Bertani (LB) previamente preparado (Figura 3).

Figura 3

Preparación de muestras *A. johnsonii* y conservación BHI



3.2.2 Determinación de la tasa de crecimiento bacteriano en LB

Se prepararon matraces R1 con 45 ml y matraces R2 con 40 ml de medio Luria Bertani, incluyendo los controles. Se realizaron tres repeticiones y tres controles (Figura 4). En cada una de las tres repeticiones, se añadieron 5 ml de cultivo bacteriano en los matraces Erlenmeyer 0R1 y 10 ml en los matraces R2, lo que permitió evaluar el efecto de diferentes concentraciones de inóculo en el crecimiento bacteriano a 37 °C y 30 rpm. Así, R1 representó un inóculo menos concentrado y R2 un inóculo más concentrado. Se midió la concentración del

cultivo utilizando espectrofotometría o turbidimetría (Estándar de McFarland) a una longitud de onda de 600 nm, y estos datos se compararon con el conteo en placa (Montes-Robledo et al., 2024).

Figura 4

Determinación de la tasa de crecimiento *A. johnsonii* en LB



3.2.3 Conteo de colonias UFC

Para el conteo en placa, se realizó primero la preparación de diluciones de la cepa microbiana mediante la técnica de diluciones seriadas. Se transfirió 1 ml de la solución microbiana a un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada, utilizando una micropipeta. La mezcla se agitó para asegurar la homogeneidad de 10^{-1} a 10^{-6} . Una vez preparadas las diluciones, se inoculó 0.1 ml de 10^{-6} en placas de agar soya casein digest. Para ello, se utilizó un asa Drigalski de vidrio, asegurándose de que el asa estuviera seca y sin exceso de muestra. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C (Figura 4). El primer conteo microbiano se realizó a las 24 y 48 horas de iniciada la incubación, para posteriormente aplicar la ecuación de tasa de crecimiento UFC (1).

$$K = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Nota. Medio de verificación para corroborar que no hay contaminación (Gualoto et al., 2011).

K= tasa de crecimiento bacteriano

LnN₂= logaritmo natural del número de colonias final (a las 48 horas)

LnN₁=Logaritmo natural del número de colonias inicial (a las 24 horas)

t₂= Tiempo final de conteo (48 h)

t₁= Tiempo inicial de conteo (24h)

3.2.4 Preparación de Muestras Madre del Metal

Para este estudio, se prepararon muestras madre del metal con concentraciones de 2000, 4000 y 8000 ppm en un volumen total de 300 ml. La preparación de estas muestras es fundamental para garantizar que se disponga de soluciones con concentraciones precisas de cromo hexavalente, que es el compuesto de interés en este análisis. La concentración en partes por millón (ppm) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

(2)

$$ppm = \frac{g \text{ (soluto)} * 10^6}{ml \text{ (solución)}}$$

Esta fórmula permite determinar cuántos gramos del soluto se requieren para alcanzar la concentración deseada en un volumen específico de solución. Para facilitar el cálculo de la masa del soluto necesaria, se deriva la siguiente ecuación

Para la preparación de la concentración de 2000 ppm, se utilizó la siguiente fórmula:

$$x = \frac{(2000)ppm * (300)ml}{10^6} = 0.6 \text{ g}$$

$$x = \frac{(4000)ppm * (300)ml}{10^6} = 1.2 \text{ g}$$

$$x = \frac{(8000)ppm * (300)ml}{10^6} = 2.4 \text{ g}$$

Luego considerar masa atómica del cromo que es de 294.185 (Tomaszewski, 2017). De los cuales se considera que 104 g son de cromo por lo que se deberá realizar una regla de 3 para tener una concentración exacta de la ppm.

$$x = \frac{0.6 * 294.185}{104} = 1.69 \text{ g}$$

$$x = \frac{1.2 * 294.185}{104} = 1.69 \text{ g}$$

$$x = \frac{2.4 * 294.185}{104} = 1.69 \text{ g}$$

Estos cálculos aseguran que la cantidad de cromo en cada solución madre sea la adecuada para los experimentos posteriores, garantizando así la precisión de la concentración esperada de la ppm esperados y la reproducibilidad de los resultados en el estudio de la cinética del cromo hexavalente.

3.2.5 Pruebas de Tolerancia con Cr⁺⁶

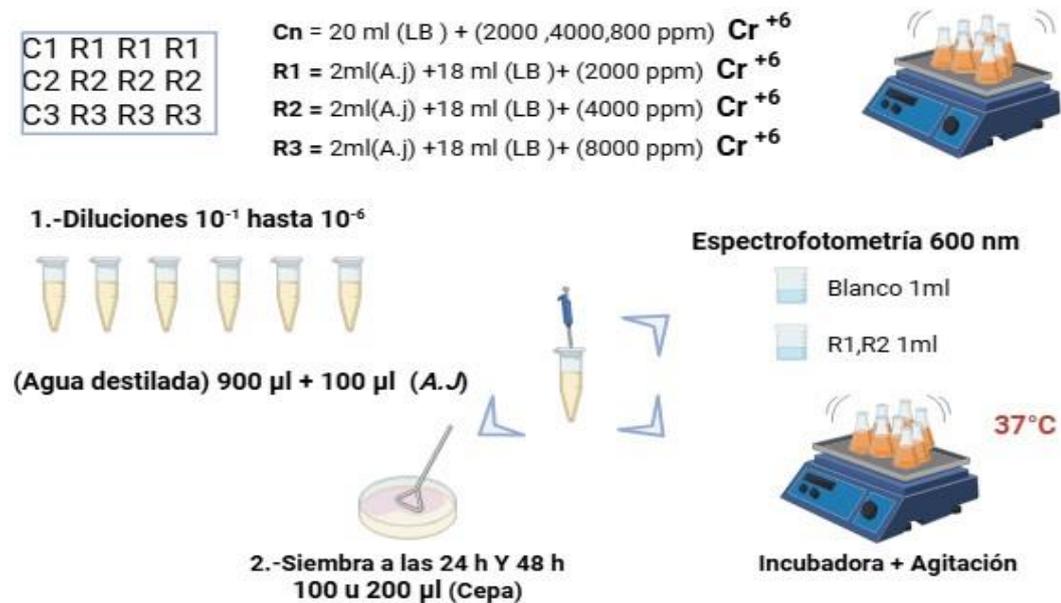
Se prepararon soluciones de dicromato de potasio en concentraciones de 2000, 4000 y 8000 ppm en medio Luria Bertani (LB), utilizando un volumen total de 300 ml y considerando la solubilidad de la sal a 20 °C (Figura 6). Antes del ensayo de tolerancia, se verificó que el pH de la solución inicial fuera siete pero también se puede considerar los rangos de 5.5 a 7.5, ajustándolo con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico según fuera necesario (Gualoto et al., 2011). Este ajuste

es crucial para asegurar que las condiciones del medio no afecten negativamente la viabilidad de *A. johnsonii* durante el experimento.

En los matraces R1, se mezclaron 2 ml de *A. johnsonii* con 18 ml de LB que contenía 2000 ppm de dicromato de potasio, repitiendo este proceso para las concentraciones de 4000 y 8000 ppm, incubando las mezclas a 37 °C y 30 rpm (Figura 6). Se realizó una siembra en placa para el conteo de control, lo que permitió la cuantificación de las colonias bacterianas y la evaluación del efecto del dicromato sobre el crecimiento de la bacteria. Los resultados obtenidos de estas siembras se compararon con los datos obtenidos por espectrofotometría, proporcionando una medida adicional de la densidad celular.

Figura 5

Pruebas de tolerancia con Cr⁺⁶



3.2.6 Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos en las pruebas con cromo hexavalente Cr⁺⁶, se utilizó la interfaz RStudio. Primero, se calcularon la media y la desviación estándar de cada grupo de tratamiento para evaluar la consistencia de la respuesta bacteriana en cada concentración. A continuación, se verificó la normalidad de los

datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965). Si los datos cumplían con esta suposición de normalidad, se procedía con una prueba ANOVA de una vía para comparar las medias de las concentraciones de Cr^{+6} entre los distintos tratamientos (One-Way ANOVA) para comparar las medias de las concentraciones de Cr^{+6} en los diferentes tratamientos. Esto permitió identificar diferencias significativas entre grupos y comprender mejor la respuesta de *A. johnsonii* ante diversas concentraciones de Cr^{+6} .

3.2.6 Árbol filogenéticos

Para analizar la relación filogenética de *Acinetobacter johnsonii*, se construyó un árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA (Pazos, 2022). Esta secuencia fue comparada con las de otras especies del género *Acinetobacter* seleccionadas por su capacidad previamente reportada para biotransformar cromo hexavalente (Cr^{6+}) a cromo trivalente (Cr^{3+}), o por su potencial de bioacumulación. Las especies consideradas fueron: *Acinetobacter baumannii* (Sathishkumar et al., 2017), *Acinetobacter* sp. ADHR1 (Montes-Robledo et al., 2024), *Acinetobacter* (Sevak et al., 2023) y *Acinetobacter* sp. AB1 (Essahale et al., 2012).

Estas secuencias específicas del gen 16S rRNA se lograron obtener a partir de la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), en donde se seleccionaron solo a aquellas cepas asociadas y capaces de hacer con estos procesos como son la biotransformación o bioacumulación de cromo en función a la literatura científica y ya reportada. Para ello fue necesario validar la identidad y su similitud entre las secuencias obtenidas de estas cepas, de tal forma se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para luego tener las secuencias alineadas este análisis permitió evaluar el grado de similitud genética respecto a las especies estudiadas y así construir el árbol filogenético permitiendo ver las posibles similitudes en los mecanismos a exposición a Cr^{6+} (National Center for Biotechnology Information, 2025).

3.3 Materiales y equipos

En la presente investigación se determinaron las distintas herramientas e insumos necesarios para evaluar la respuesta de la bacteria al cromo hexavalente Cr⁶⁺. El espectrofotómetro permitió medir el crecimiento la densidad óptica, mientras que la cámara de flujo laminar permitió en condiciones estériles para evitar contaminación.

Tabla 3

Materiales y equipos

N°	Materiales	N°	Equipos	N°	Insumos
1	Asa Driglaski De Vidrio	1	Espectrofotómetro	1	Agar Soya caesin digest.
50	Cotonetes	1	Cámara de flujo laminar	1	Medio Luria Bertani (LB)
60	Cajas de Petri	1	Microscopio	1	Cromo hexavalente
60	Tubos de ensayo	2	Incubadoras		
54	Tubos eppendorf	1	Mini agitador		
15	Boecos	1	Autoclave		
15	Frascos Erlenmeyer	1	Balanza Analítica		
2	Pipetas	1	Estufa		
2	Caja de guantes				
2	Caja de mascarillas				

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

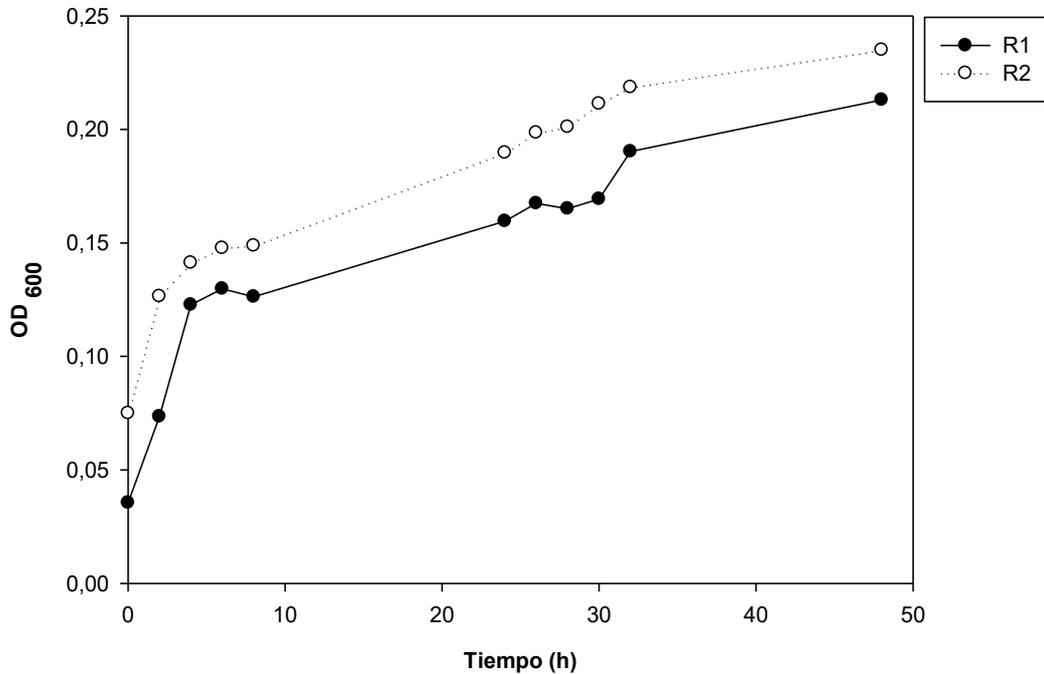
4.1 Cinética de crecimiento de *Acinetobacter johnsonii* en ausencia de cromo hexavalente

El crecimiento de cepa antártica en medio LB bajo condiciones aeróbicas y sin la presencia de cromo hexavalente mostró un comportamiento distinto al patrón típico de tres fases (latencia, exponencial y estacionaria) observado en muchas bacterias. A través del monitoreo de la densidad óptica (OD₆₀₀) durante 48 horas, se identifican tres etapas principales: fase exponencial temprana, fase de transición metabólica y fase estacionaria prolongada, con un segundo impulso de crecimiento antes de alcanzar el equilibrio poblacional (Tian et al., 2016). Lo llamativo es que antes de llegar a la fase estacionaria, hubo un segundo aumento en el crecimiento, lo cual sugiere que la bacteria activó nuevas vías metabólicas o usó otro tipo de nutriente presente en el medio (Deng et al., 2021).

Al iniciar las mediciones a partir de las 6 horas se registró un incremento constante respecto a la OD⁶⁰⁰ pasando de 0.0355 a 0.1298 (Figura 7). Por lo que este comportamiento indica que la cepa no requirió una fase de latencia claramente definida, por lo que esto podría deberse por su alta versatilidad metabólica y su adaptabilidad al medio líquido LB, como se ha reportado en otros estudios respecto al género *Acinetobacter* (Montes-Robledo et al., 2024). Por ello es una característica que permite a la bacteria poder iniciar su multiplicación muy rápidamente tras el inóculo de esta aprovechando todos los nutrientes disponibles en el medio. Después entre las 6 y 8 horas, se logró observar la disminución en la pendiente del su crecimiento, esto que sugiere a una transición metabólica o una respuesta a ciertos factores ambientales limitantes en el medio (Zhong et al., 2023).

Figura 6

Curva de crecimiento Acinetobacter johnsonni en LB



A partir de las 24 horas, se registró un nuevo incremento en la densidad celular, aunque este proceso no fue inmediatamente lineal. Entre las 24 y 30 horas, la OD₆₀₀ mostró una ligera estabilización, oscilando entre 0.1596 y 0.1693 (Figura 7). Este período de equilibrio transitorio sugiere una fase de ajuste metabólico, durante la cual la bacteria pudo haber activado rutas alternativas para utilizar sustratos menos preferentes presentes en el medio LB, como aminoácidos y péptidos (Montes-Robledo et al., 2024). Este fenómeno es común en microorganismos con alta versatilidad metabólica, donde la transición entre fuentes de carbono requiere tiempo para la síntesis de enzimas especializadas (Tian et al., 2016).

En el periodo de las 30 horas se observó una segunda etapa de crecimiento, que fue más notoria a las 48 horas, alcanzando un valor máximo de 0.213 en densidad óptica (OD). Este repunte sugiere que la bacteria logra adaptarse a los cambios en la cantidad de nutrientes, lo cual resulta importante para sobrevivir en ambientes difíciles y también podría ser útil en procesos de limpieza de

contaminantes (Deng et al., 2021). Además, que la cepa, el hecho de que atraviese una fase de pausa prolongada y luego tenga varios momentos donde vuelve a crecer, muestra que su comportamiento es variable. Esto dependería de varios factores, como las condiciones del medio, la presencia de oxígeno y la capacidad que tiene la especie para ajustarse a distintos entornos (Zhong et al., 2023).

En análisis estadístico se obtuvo ($p = 0.078$) lo cual quiere decir que no mostró diferencias marcadas entre las réplicas 5 ml y 10 ml de inóculo, lo que sugiere que la cantidad empleada no influyó de forma significativa en el crecimiento bacteriano bajo estas condiciones. Además, mencionar a Islas-Espinoza & Bojórquez-Aguilar, (2011); Zhong et al., (2023) que el volumen del inóculo no siempre limita el crecimiento, especialmente cuando el medio de cultivo es adecuado. De igual manera. Ruesta Herencia & Salazar Ciudad, (2021) han mencionado que la calidad del medio puede influir más que la cantidad del inóculo, lo cual resalta la importancia de ajustar bien las condiciones de cultivo para favorecer el desarrollo bacteriano.

4.1.1 Tasa de crecimiento (UFC) en ausencia de cromo hexavalente

La tasa de crecimiento se evaluó a través del conteo de serias unidades formadoras de colonias (UFC), obteniendo resultados significativos que se detallan en la (Figura 8). Se observó una densidad poblacional entre 4×10^6 UFC entre las primeras 4 horas, esto indica que la bacteria estaba comenzando a establecerse en el medio. En este caso es bajo los UFC lo cual es típico en las primeras fases iniciales de crecimiento conocida como la fase de adaptación (Montes-Robledo et al., 2024). Y a las 48h densidad poblacional estuvo entre 181.3×10^6 UFC con una tasa de crecimiento de $k = 0.032 \text{ h}^{-1}$, esto confirma la viabilidad y la eficiencia de esta cepa en el medio LB (Azario et al., 2010).

Figura 7

Colonias de Acinetobacter johnsonii en medio sólido



Nota. Imagen de caja de Petri que muestra el crecimiento bacteriano. Esta observación sirve como verificación del cultivo realizado bajo las condiciones experimentales establecidas.

La tasa de crecimiento observada es comparable a la reportada por Montes-Robledo et al., (2024), quienes encontraron tasas similares en otras cepas de *Acinetobacter* en medios ricos en nutrientes. Además, Jaiswal et al., (2018) indican que la capacidad de las bacterias para proliferar o crecer rápidamente es un indicador clave y de utilidad en aplicaciones de biorremediación. Por otro lado Sathishkumar et al., (2017) también enfatizan que la tasa de crecimiento puede ser un predictor de la eficacia en la reducción de contaminantes, lo que refuerza la importancia de estas observaciones en el contexto de lo que sería la biorremediación.

4.2 Cinética de crecimiento a 2000 ppm de cromo hexavalente

A una concentración de 2000 ppm de Cr^{6+} en las primeras 24 horas se identificó una fase de retardo prolongada con un μ de promedio de 0.155 (OD) este dato muestra que la bacteria enfrentó un estrés significativo por la toxicidad del metal pesado Cr^{6+} de tal forma lo que retrasó su adaptación y multiplicación

(Sathishkumar et al., 2017). Y es así que durante este período, activó mecanismos metabólicos y fisiológicos para sobrevivir en un entorno hostil, como la síntesis de proteínas de estrés y bombas de eflujo para expulsar iones tóxicos (Montes-Robledo et al., 2024).

En este caso la fase exponencial se pudo observar a partir de las 24 horas la cual obtuvo un promedio de 0.1804 OD a las 48 horas, por ende este incremento sugiere que tras la adaptación inicial, la bacteria optimizó su crecimiento, evidenciando una respuesta fisiológica positiva al estrés por cromo (Zhang et al., 2019). Además de lo comentado, hay algunos estudios en el área de conocimiento, que han hecho énfasis en aquellas cepas que han sido identificadas y que pueden presentar niveles altos de tolerancia de Cr^{6+} a través del proceso de reducción enzimática con cromato reductasas, aunque la eficacia empieza a verse afectada con el cambio de cepas (Jaiswal et al., 2018; Sevak et al., 2023). Otro aspecto para considerar es que, tal como indican, Sathishkumar et al. (2017) puede inducir respuestas adaptativas la exposición a metales pesados, revalidando la afirmación de que bajo condiciones extremas puede haber mecanismos de resistencia.

En la fase estacionaria, un OD máximo de 0.307 a las 120 horas, fue una adaptación moderada al estrés por cromo hexavalente. Sevak et al., (2023) reportaron que algunas cepas de *Acinetobacter* podrán tolerar niveles altos de Cr^{6+} , implicando que el proceso de adaptación es dinámico y por tanto depende de las cepas. Sin embargo, hay mucho más por investigar para tener una comprensión más clara de los mecanismos de tolerancia de los que se han logrado diferentes eficacias en la reducción de contaminantes, tal como lo mencionan, por ejemplo, Jaiswal et al. (2018) quienes también afirman que es necesario entender cómo funcionan estos mecanismos para diseñar estrategias adecuadas de biorremediación.

4.3 Cinética de crecimiento a 4000 ppm de cromo hexavalente

El crecimiento de la cepa se al inicio, se ve algo limitado ya que estaría afectando negativamente la capacidad de la bacteria para adaptarse a 4000 ppm de Cr^{6+} durante las primeras horas, la bacteria permanece en la fase lag hasta las 24 horas, con un promedio de $\text{OD} = 0.1893$. Este comportamiento sugiere que está experimentando un estrés considerable debido a la toxicidad del cromo hexavalente (Montes-Robledo et al., 2024). Además, esta la fase exponencial de 0.2156 OD a (24 - 48 h), lo que sugiere que, pese a las condiciones adversas, la bacteria fue capaz de activar mecanismos de adaptación y reiniciar su crecimiento (Sevak et al., 2023).

Asimismo, en esta fase estacionaria, se llega a estabilizar con un $\text{OD} = 0.457$ a las 120 horas entonces mostrando que la bacteria ha encontrado un equilibrio en su crecimiento, aunque a niveles más bajos que en ausencia de cromo estos hallazgos son consistentes con los reportes encontrados que la exposición a niveles intermedios de Cr^{6+} puede afectar el crecimiento bacteriano, sugiriendo que la adaptación es un proceso gradual (Sevak et al., 2023). Y según Montes-Robledo et al., (2024) también documentaron que la capacidad de adaptación a condiciones adversas es una característica clave de las cepas de *Acinetobacter*.

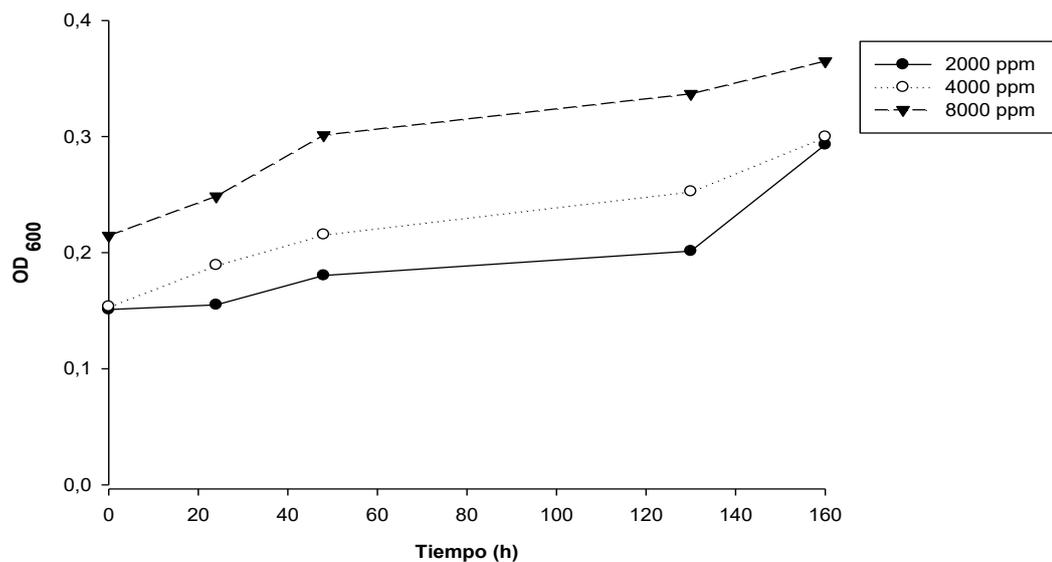
4.4 Cinética de crecimiento a 8000 ppm de cromo hexavalente

La concentración más alta de cromo (8000 ppm), el crecimiento se ve severamente inhibido, lo que pone de manifiesto la toxicidad del cromo hexavalente en niveles elevados. A pesar de esto, *A. johnsonii* mantiene cierta capacidad de crecimiento, con un OD promedio de 0.2485 durante las primeras 24 horas. En la fase exponencial, alcanza un valor de 0.3013 a las 48 horas, estabilizándose finalmente en 0.365 a las 120 horas. Estos resultados son coherentes con los de Ruesta Herencia & Salazar Ciudad (2021) quienes encontraron que concentraciones elevadas de Cr^{6+} pueden ser tóxicas para varias especies bacterianas, afectando su capacidad de crecimiento y reproducción. Además, Verma & Kuila, (2019)

destacan que la exposición a altas concentraciones de metales pesados puede inducir estrés oxidativo, lo que afecta negativamente el crecimiento y la reproducción bacteriana.

Figura 8

Curva de tolerancia de A. johnsonii al Cr⁶⁺



Nota. La gráfica muestra las fases de crecimiento (lag, exponencial y estacionaria) de *A. johnsonii* en presencia de 2000, 4000 y 8000 ppm de Cr⁶⁺, según las mediciones de OD tomadas a intervalos regulares.

El análisis estadístico ANOVA para las tres concentraciones determinadas cromo hexavalente (2000, 4000 y 8000) ppm revelaron que hay diferencias significativas en las fases de crecimiento de ($p < 0.001$). Por ello este resultado (Tabla 4) es muy importante porque confirma que la concentración de metal tiene un cierto efecto directo y significativo en el crecimiento de la bacteria respaldando observaciones previas sobre los efectos toxicidad de los metales pesados en organismos.

Tabla 4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C3	3	0.102	0.0341	258.48	0.000
Error	12	0.002	0.0001		
Total	15	0.104			

4.4.1 Tasa de crecimiento en función a la concentración de Cr

La evaluación de la tasa de crecimiento a diferentes concentraciones de cromo hexavalente (Cr^{6+}) reveló resultados significativos (Figura 10). A 2000 ppm, la población alcanzó 5×10^6 UFC a las 24 horas, con una tasa de crecimiento de $k = 0.0016 \text{ h}^{-1}$. Este crecimiento inicial indica que, aunque la bacteria enfrenta condiciones adversas, todavía puede establecerse en el medio. Según Islas-Espinoza & Bojórquez-Aguilar (2011) las bacterias del género *Acinetobacter* pueden mostrar una notable capacidad de adaptación, lo que les permite sobrevivir en entornos contaminados. Además, Sathishkumar et al., (2017) enfatizan que la capacidad de crecimiento en condiciones estresantes es un indicador clave de la viabilidad de las especies bacterianas en aplicaciones de biorremediación.

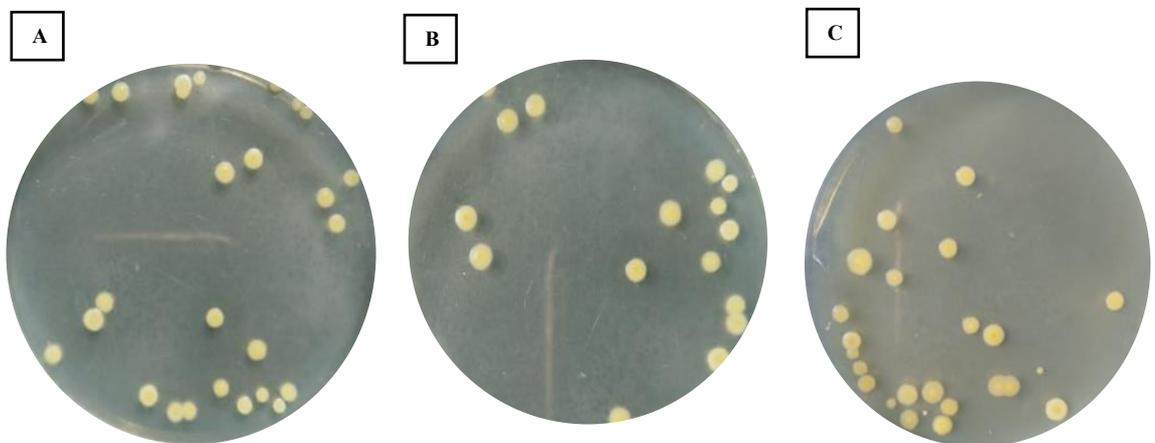
A 4000 ppm, la densidad población tubo un aumentó a 13.3×10^6 UFC, y una tasa de crecimiento de $k = 0.0113 \text{ h}^{-1}$, esto sugiere que una mejor adaptación. Por eso este aumento en la población refleja la capacidad de poder optimizar su crecimiento, a pesar de la exposición al cromo hexavalente. Según Sevak et al., (2023) mencionan que ciertas cepas de *Acinetobacter* son capaces de tolerar niveles elevados de Cr^{6+} , por ello sugiere que esta adaptación es un proceso dinámico.

Y finalmente, a 8000 ppm, la densidad la población llevo a 27×10^6 UFC, con la tasa de crecimiento de $k = 0.0174 \text{ h}^{-1}$. Pese a la alta concentración de cromo, la bacteria pudo lograr mantener una población viable, esto sugiere que tiene mecanismos de tolerancia y adaptación. Por ello este hallazgo es coherente con lo

reportado por Ruesta Herencia & Salazar Ciudad (2021) que a concentraciones elevadas del Cr^{6+} pueden ser tóxicas para algunas bacterianas, por ello afectando su capacidad de crecimiento y su reproducción. Y, por otro lado, Verma & Kuila (2019) destacan que las exposiciones a altas concentraciones de metales pesados pueden inducir a un estrés oxidativo, por tal esto afecta negativamente el crecimiento y la reproducción bacteriana.

Figura 9

Colonias de Acinetobacter johnsonii a exposición de Cr^6



Nota. Imagen de caja de Petri que muestra el crecimiento bajo exposición al cromo hexavalente (Cr^{6+}). Esta observación confirma la viabilidad del cultivo en presencia del metal, bajo las condiciones experimentales establecidas (A_2000, B_4000 y C_8000) ppm.

4.6 Mecanismos de tolerancia al cromo hexavalente

El análisis filogenético reveló que *la cepa antártica* presenta una similitud genética superior al 95% con otras especies del género *Acinetobacter*, como *Acinetobacter sp.* AB1, la cual es conocida por su capacidad para reducir el cromo hexavalente Cr^{6+} un cromo trivalente Cr^{3+} y potencialmente bioacumularlo (Figura 11). Esto sugiere que *A. johnsonii* podría emplear mecanismos similares para enfrentar la toxicidad del cromo (Essahale et al., 2012).

Figura 10

Árbol filogenético



Una de las estrategias más comunes en la tolerancia al Cr^{6+} es la producción de enzimas reductoras, como la reductasa de cromo, que transforma de Cr^{6+} a Cr^{3+} , un estado menos tóxico y más fácil de manejar para las células bacterianas (Gupta & Rastogi, 2009). Estudios previos han identificado genes como ChrR, los cuales codifican estas enzimas reductoras, en otras especies del género *Acinetobacter*. Considerando la alta similitud genética, es probable que también posea estos mecanismos genéticos (Montes-Robledo et al., 2024).

En la (Tabla 4) se indica la comparación de las distintas cepas del género *Acinetobacter*, destacando que estas bacterias poseen la capacidad de biotransformar Cr^{6+} a Cr^{3+} , y más aún para unos casos incluso bioacumular el metal. De tal forma la información recopilada refuerza la hipótesis sobre la capacidad de contar con habilidades metabólicas muy similares para la detoxificación del Cr^{6+} .

Tabla 5

Comparación de capacidades funcionales entre especies de Acinetobacter

Género	Biotransformar Cr^{6+} a Cr^{3+}	Bioacumulación
<i>Acinetobacter baumannii</i>	SI	-
<i>Acinetobacter sp.</i> (ADHR1)	SI	-
<i>Acinetobacter junii</i>	SI	SI
<i>Acinetobacter ABI</i>	SI	SI

Nota. (Sathishkumar et al., 2017) (Montes-Robledo et al., 2024)(Sevak et al., 2023)(Essahale et al., 2012)

Además, estudios como el de Zhong et al., (2023) han utilizado árboles filogenéticos basados en genes conservados, como *gyrB*, para vincular a *Acinetobacter johnsonii* con funciones metabólicas específicas, tales como la eliminación eficiente de nitrógeno a bajas temperaturas. Por otro lado, Pazos et al., (2025) resaltan la utilidad del análisis filogenético con marcadores como 16S rRNA y *rpoB* para inferir perfiles metabólicos y patrones de resistencia genética en cepas de *A. baumannii* aisladas de ambientes extremos.

Los resultados del análisis en BLAST en base del gen ARN ribosómico 16S de *Acinetobacter johnsonii* se mostraron altos niveles de identidad de >95% en relación con otras secuencias del género *Acinetobacter* capaces de biotransformar y bioacumular Cr^{6+} como *A. baumannii*, *A. junii* y *Acinetobacter sp.* AB1 (Essahale et al., 2012; Sathishkumar et al., 2017; Sevak et al., 2023). Con una similitud genética estrecha en la relación evolutiva entre estas y una posible conservación de las funciones metabólicas claves, como en este caso incluidas aquellas que son asociadas a la tolerancia al Cr^{6+} . En donde estudios previos ya reportados estas cepas contienen el gen *chrR* la enzima de reductasa capaces de biotransformar el Cr^{6+} a Cr^{3+} , es decir, una forma menos tóxica (Essahale et al., 2012; Gupta & Rastogi, 2009). Por lo tanto, la alta similitud filogenética, es muy razonable a inferir que también se podría contar con estos mecanismos de detoxificación muy similares (Montes-Robledo et al., 2024).

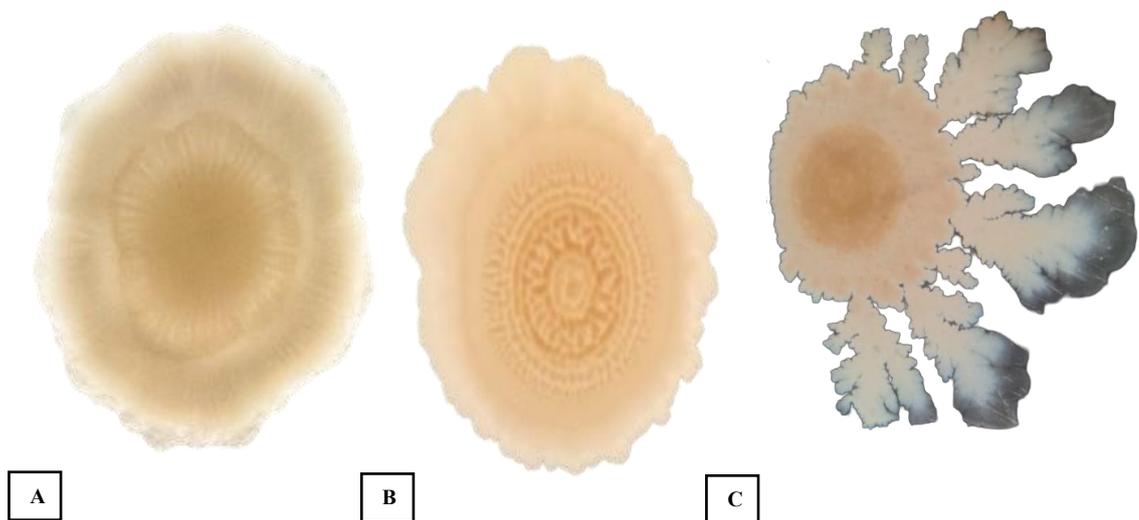
4.6 Cambios morfológicos como mecanismo de tolerancia

Adicionalmente, se han observado cambios morfológicos bajo condiciones de estrés por cromo hexavalente. Estos cambios pueden incluir la formación de ramificaciones o alteraciones en la estructura de las colonias, lo que podría ser una respuesta adaptativa que les permita mejorar su capacidad de supervivencia en entornos adversos. Hashemi et al., (2019) documentan que tales alteraciones pueden ser indicativas de estrategias defensivas que las bacterias utilizan para minimizar el impacto del estrés ambiental.

Se observaron ciertas alteraciones en su morfología, es decir las colonias bajo la exposición al estrés de Cr^{6+} (Figura 12), se pueden considerarse como una vía adaptativa de la cepa para la tolerancia: A $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ se identificó que estas colonias presentaban una estructura estable y aún más definida en sus relieves con menor variabilidad. Y a comparación de a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$: Las colonias se mostraron una formación de ramificaciones con relieves menos definidos, de esta forma se podría interpretarse que es un fenómeno adaptativo de la cepa para combatir el estrés al metal.

Figura 11

Respuesta morfológica a la exposición de Cr^{6+}



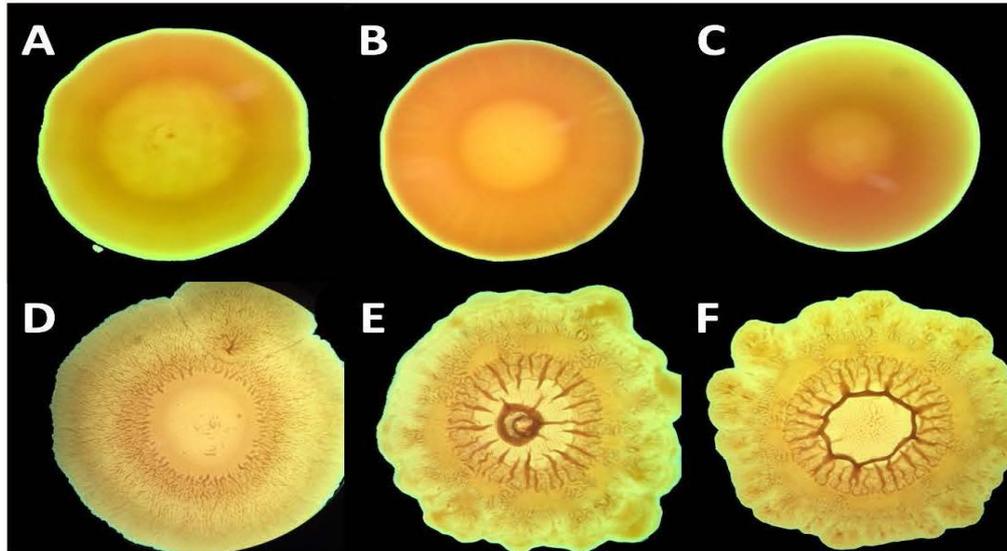
Nota. **A.** Sin exposición $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; **B.** Exposición a cromo $10\text{ }^{\circ}\text{C}$; **C.** Exposición a cromo $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los resultados de este estudio muestran que la bacteria antártica presenta respuestas morfológicas significativas (formación de ramificaciones, relieves y cambios en la estabilidad de las colonias) a la exposición a cromo hexavalente (Cr^{+6}), lo que sugiere una adaptación metabólica y estructural para combatir el estrés inducido por este compuesto. En este sentido, la investigación de Hashemi et al., (2019) demuestra (Figura 13) que la exposición prolongada a clorhexidina, un antiséptico de amplio espectro utilizado en aplicaciones clínicas también induce cambios morfológicos en bacterias Gramnegativas, como alteraciones estructurales

y formación de ramificaciones, reflejando estrategias adaptativas frente a distintos tipos de estrés

Figura 12

Morfología de las colonias de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* tras exposición a clorhexidina.



Nota. Tomada de “Proteomic Analysis of Resistance of Gram-Negative Bacteria to Chlorhexidine” (p. 210), por M. M. Hashemi et al., 2019, *Frontiers in Microbiology*, 10(210).

Estos reportes destacan la capacidad de las bacterias Gramnegativas lo que en la actualidad representa un desafío en tratamientos de infecciones resistentes. Y destaca la similitud en las respuestas morfológicas mostrando que tanto el cromo hexavalente y un antiséptico (clorhexidina) pueden activar ciertos mecanismos de resistencia similares, lo que podría afectar la efectividad de los tratamientos antimicrobianos. Por lo que poder comprender estos mecanismos adaptativos son esenciales para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y explorar posibles aplicaciones en biorremediación, y es aquí donde las bacterias podrían ayudar a reducir la contaminación ambiental. Enfatizando que futuros estudios deben centrarse también en identificar los mecanismos de estas adaptaciones y evaluar la efectividad de distintos antimicrobianos en la prevención de la resistencia bacteriana (Hashemi et al., 2019).

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Acinetobacter johnsonii mostró una cinética de crecimiento caracterizada por fases múltiples bajo condiciones controladas. Alcanzó una fase estacionaria estable a las 48 horas con una densidad poblacional de 181.3×10^6 UFC con una tasa de crecimiento promedio de $k = 0.032 \text{ h}^{-1}$. Este comportamiento fue monitoreado mediante espectrofotometría y validado con conteo de UFC, lo cual confirma su viabilidad celular en medio LB.

Por otro lado bacteria fue capaz de tolerar hasta 8000 ppm de Cr^{6+} . Donde inicialmente se observó retraso su crecimiento, también mencionar que las tasas de crecimiento registradas mostrando una adaptación a medida de que aumenta la concentración del metal, y así respondiendo a la pregunta sobre niveles de tolerancia y cinética de crecimiento frente al Cr^{6+} .

Además se identificaron cambios morfológicos en respuesta a la exposición de Cr^{6+} , con alteraciones en la estructura de las colonias y la formación de ramificaciones. También cabe mencionar que el análisis filogenético muestra una similitud genética superior al 95% con cepas del mismo género capaces de biotransformar (gen *chrR* reductosa) y bioacumular de Cr^{6+} .

5.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios moleculares para identificar el gen *chrR*, asociado a la reducción del cromo y estudiar el comportamiento de la cepa con otros metales pesados.

REFERENCIAS

- Abdallah, M. (2023). *Accumulation and distribution of heavy metals in surface sediments from the continental shelf adjacent to Abu Qir Bay, Egypt, as a function of grain size. 1, 3*. <https://doi.org/10.1007/s00367-022-00743-w>
- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M. Q. (2021). Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. *Toxics*, 9(3), 1–34. <https://doi.org/10.3390/TOXICS9030042>
- Archivo *BacDiveID:10.13145/bacdive8090.20240510.9* | *BacDive*. (n.d.). Retrieved July 6, 2024, from <https://bacdive.dsmz.de/pdf-view/8090?doi=doi%3A10.13145%2Fbacdive8090.20240510.9>
- ATSDR. (2012). *RESUMEN DE SALUD PÚBLICA Cromo*. www.atsdr.cdc.gov/es
- Azario, R. R., Salvarezza, S. A., Ibarra, A., & García, M. del C. (2010). Efecto del Cromo Hexavalente y Trivalente sobre el Crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218. *Información Tecnológica*, 21(1), 51–56. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642010000100009>
- Biswas, R., Halder, U., Urmi, Kabiraj, A., Mondal, A., & Rajib Bandopadhyay, R. (2021). *Overview on the role of heavy metals tolerance on developing antibiotic resistance in both Gram-negative and Gram-positive bacteria. 203*, 2761–2770. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02275-w>
- Biswas, R., Halder, U., Kabiraj, A., Mondal, A., & Bandopadhyay, R. (2021). Overview on the role of heavy metals tolerance on developing antibiotic resistance in both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Archives of Microbiology*, 203(6), 2761–2770. <https://doi.org/10.1007/S00203-021-02275-W/METRICS>
- Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). *Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
- CODIGO ORGANICO DEL AMBIENTE (2017). https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/01/CODIGO_ORGANICO_AMBIENTE.pdf

- CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR, 449 Registro Oficial
25 (2008). https://www.defensa.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2021/02/Constitucion-de-la-Republica-del-Ecuador_act_ene-2021.pdf
- Deng, Y., Du, H., Tang, M., Wang, Q., Huang, Q., He, Y., Cheng, F., Zhao, F., Wang, D., & Xiao, G. (2021). Biosafety assessment of *Acinetobacter* strains isolated from the Three Gorges Reservoir region in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99274-0>
- Eggs, N. E. (2017). *Comparación de tratamientos actuales para la eliminación de materiales pesados en efluentes industriales en general*. <https://ria.utn.edu.ar/server/api/core/bitstreams/840d0288-a70f-445f-95dc-868a9e174654/content>
- Essahale, A., Malki, • M, Marín, • I, & Moumni, • M. (2012). *Hexavalent Chromium Reduction and Accumulation by Acinetobacter AB1 Isolated from Fez Tanneries in Morocco*. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0187-1>
- Gerrish, L., Ireland, L., Fretwell, P., & Cooper, P. (2024). Medium resolution vector polylines of the Antarctic coastline (7.9) [Data set]. *UK Polar Data Centre, Natural Environment Research Council, UK Research & Innovation*. <https://doi.org/https://doi.org/10.5285/f2792d06-1e9d-4e00-a5c6-37d43bee5297>
- Gualoto, M. Á., Gualoto, M. A., & GONZÁLEZ, D. N. (2011). *Tolerancia a plomo (Pb), cromo (Cr) y zinc (Zn) de microorganismos alto andinos*. https://www.academia.edu/53266547/Tolerancia_a_plomo_Pb_cromo_Cr_y_zinc_Zn_de_microorganismos_alto_andinos
- Gupta, V. K., & Rastogi, A. (2009). Biosorption of hexavalent chromium by raw and acid-treated green alga *Oedogonium hatei* from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 163(1), 396–402. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2008.06.104>
- Hashemi, M. M., Holden, B. S., Coburn, J., Taylor, M. F., Weber, S., Hilton, B., Zaugg, A. L., McEwan, C., Carson, R., Andersen, J. L., Price, J. C., Deng, S., & Savage, P. B. (2019). Proteomic analysis of resistance of gram-negative

bacteria to chlorhexidine and impacts on susceptibility to colistin, antimicrobial peptides, and ceragenins. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00210>

Islas-Espinoza, M., & Bojórquez-Aguilar, R. (2011). Bacterias reductoras de Cr+6 y su potencial biotecnológico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental (México) Num.3 Vol.27*. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/136138>

Jaiswal, A., Verma, A., & Jaiswal, P. (2018). Detrimental Effects of Heavy Metals in Soil, Plants, and Aquatic Ecosystems and in Humans. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 37(3), 183–197. <https://doi.org/10.1615/JENVIRONPATHOLTOXICOLONCOL.2018025348>

Jiang, Y., Qi, H., Zhang, X., & Chen, G. (2012). Inorganic impurity removal from waste oil and wash-down water by *Acinetobacter johnsonii*. *Journal of Hazardous Materials*, 239–240, 289–293. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.08.076>

Jiang, Y., Qi, H., & Zhang, X. M. (2018). Co-biodegradation of anthracene and naphthalene by the bacterium *Acinetobacter johnsonii*. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 53(5), 448–456. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1409579>,

Lee, M., Woo, S. G., & Ten, L. N. (2012). Characterization of novel diesel-degrading strains *Acinetobacter haemolyticus* MJ01 and *Acinetobacter johnsonii* MJ4 isolated from oil-contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 2057–2067. <https://doi.org/10.1007/S11274-012-1008-3>,

LEY ORGANICA DE RECURSOS HIDRICOS USOS Y APROVECHAMIENTO DEL AGUA (2014). <https://www.regulacionagua.gob.ec/wp-content/uploads/2019/06/Ley-Org%C3%A1nica-de-Recursos-H%C3%ADricos-Usos-y-Aprovechamiento-del-Agua.pdf>

- McConnell, J. R., Chellman, N. J., Wensman, S. M., Plach, A., Stanish, C., Santibáñez, P. A., Brugger, S. O., Eckhardt, S., Freitag, J., Kipfstuhl, S., & Stohl, A. (2023). *Hemispheric-scale heavy metal pollution from South American and Australian mining and metallurgy during the Common Era*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169431>
- Montes-Robledo, A., Baena-Baldiris, D., & Baldiris-Avila, R. (2024). Reduction of Cr(VI) by planktonic cells and biofilm of *Acinetobacter* sp. (ADHR1) isolated from electroplating wastewater. *Environmental Technology & Innovation*, *33*, 103521. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103521>
- Naciones Unidas. (2018). *La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe*. www.issuu.com/publicacionescepal/stacks
- National Center for Biotechnology Information. (2025). *BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local*. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Pazos, C. (2022). *EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD POR ACCIÓN DE UNA BACTERIA ANTÁRTICA [UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE]*. <https://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/13331/2/03%20BIO%2046%20TRABAJO%20DE%20GRADO.pdf>
- Pazos, C., Gualoto, M., Oña, T., Velarde, E., Portilla, K., Cabrera-García, S., Banchón, C., Dávila, G., Hernández-Alomia, F., & Bastidas-Caldes, C. (2025). Molecular Detection of blaTEM and blaSHV Genes in ESBL-Producing *Acinetobacter baumannii* Isolated from Antarctic Soil. *Microorganisms*, *13*(3), 482. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS13030482/S1>
- Piedad, N., Montoya, M., Casas, P. A., Wandurraga, C. C., & Casas, A. (2010). Plomo, cromo III y cromo VI y sus efectos sobre la salud humana. *Ciencia y Tecnología Para La Salud Visual y Ocular*, *8*(1), 77–88. <https://saludvisual.lasalle.edu.co/article/view/1660>
- PLAN DE DESARROLLO Para El Nuevo Ecuador 2024 • 2025 (2024). <https://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/2024/02/PND2024-2025.pdf>

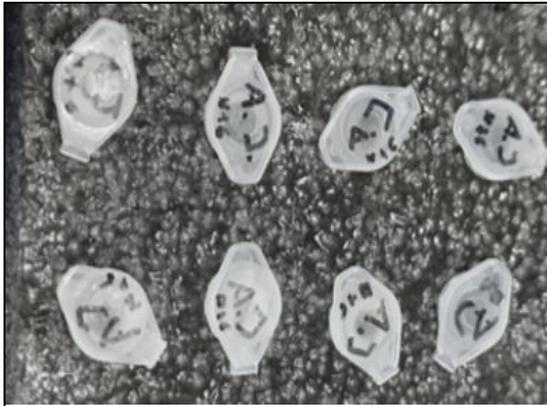
- REGLAMENTO AL CODIGO ORGANICO DEL AMBIENTE (2019).
<https://site.inpc.gob.ec/pdfs/lotaip2020/REGLAMENTO%20AL%20CODIGO%20ORGANICO%20DEL%20AMBIENTE.pdf>
- Ruesta Herencia, S. R., & Salazar Ciudad, B. M. M. (2021). *Aislamiento y aplicación de bacterias para la remoción de Cr+6 en efluentes de curtiduría: Una revisión sistemática* [Universidad César Vallejo].
<https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/119671>
- Sanchis, A. (2021, November 6). *La belleza arquitectónica de las estaciones científicas de la Antártida, cada una de su padre y de su madre*.
<https://www.xataka.com/magnet/belleza-arquitectonica-estaciones-cientificas-antartida-cada-su-padre-su-madre>
- Sathishkumar, K., Murugan, K., Benelli, G., Higuchi, A., & Rajasekar, A. (2017). Bioreduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas stutzeri* L1 and *Acinetobacter baumannii* L2. *Annals of Microbiology*, 67(1), 91–98.
<https://doi.org/10.1007/S13213-016-1240-4/TABLES/2>
- Sevak, P., Pushkar, B., & Mazumdar, S. (2023a). Mechanistic evaluation of chromium bioremediation in *Acinetobacter junii* strain b2w: A proteomic approach. *Journal of Environmental Management*, 328, 116978.
<https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2022.116978>
- Sevak, P., Pushkar, B., & Mazumdar, S. (2023b). Mechanistic evaluation of chromium bioremediation in *Acinetobacter junii* strain b2w: A proteomic approach. *Journal of Environmental Management*, 328, 116978.
<https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2022.116978>
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591.
<https://doi.org/10.2307/2333709>
- Soni, S. K., Singh, R., Awasthi, A., Singh, M., & Kalra, A. (2013). In vitro Cr(VI) reduction by cell-free extracts of chromate-reducing bacteria isolated from tannery effluent irrigated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(3), 1661–1674. <https://doi.org/10.1007/S11356-012-1178-4/TABLES/6>
- Téllez, J., Carvajal Rox, M., & Gaitán, A. M. (2004). Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de

- curtiembres. *Rev. Fac. Med. (Bogotá)*, 50–61.
<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/download/43297/44595>
- Tian, S., Ali, M., Xie, L., & Li, L. (2016). Genome-sequence analysis of *Acinetobacter johnsonii* MB44 reveals potential nematode-virulent factors. *SpringerPlus*, 5(1), 986. <https://doi.org/10.1186/S40064-016-2668-5>
- Tomaszewski, R. (2017). *Citations to chemical resources in scholarly articles: CRC Handbook of Chemistry and Physics and The Merck Index*. <https://doi.org/10.1007/s11192-017-2437-4>
- Verma, S., & Kuila, A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100369. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100369>
- Wang, W., Chen, X., Yan, H., Hu, J., & Liu, X. (2019a). Complete genome sequence of the cyprodinil-degrading bacterium *Acinetobacter johnsonii* LXL_C1. *Microbial Pathogenesis*, 127, 246–249. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.11.016>
- Wang, W., Chen, X., Yan, H., Hu, J., & Liu, X. (2019b). Complete genome sequence of the cyprodinil-degrading bacterium *Acinetobacter johnsonii* LXL_C1. *Microbial Pathogenesis*, 127, 246–249. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.11.016>
- Xie, S., Liu, J., Li, L., & Qiao, C. (2009). Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 21(1), 76–82. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60014-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60014-0)
- Zhang, Y., Wang, X., Wang, W., Sun, Z., & Li, J. (2019). Investigation of growth kinetics and partial denitrification performance in strain *Acinetobacter johnsonii* under different environmental conditions. *Royal Society Open Science*, 6(12). <https://doi.org/10.1098/RSOS.191275>
- Zhong, Y. ;, Xia, H., Zhong, Y., & Xia, H. (2023). Characterization of the Nitrogen Removal Potential of Two Newly Isolated *Acinetobacter* Strains under Low Temperature. *Water* 2023, Vol. 15, Page 2990, 15(16), 2990. <https://doi.org/10.3390/W15162990>

ANEXOS

ANEXO 1

Registro fotográfico



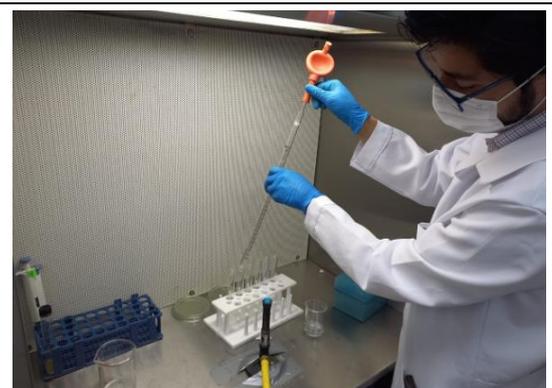
a) Conservación por triplicado



b) Cromo (Cr^{6+}) a diferentes concentraciones: 2000,4000, 8000 ppm



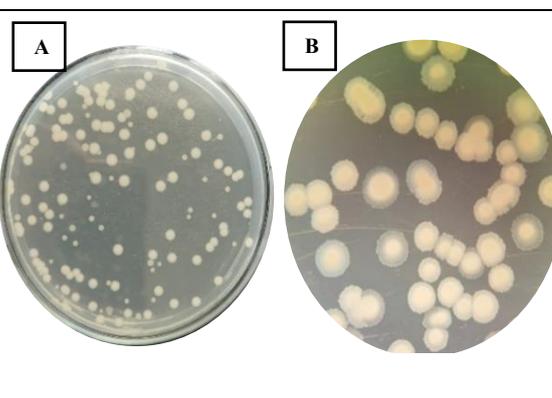
c) Toma de la muestra



d) Medición: bacteria más Cr^{6+}



f) Espectrofotómetro OD^{600}



g) **A:** sin exposición, **B:** exposición a Cr^{6+}