Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión

Facultad de Ingeniería Agraria, Industrias Alimentarias y Ambiental

Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental

Efecto de metales pesados sobre una levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima

Tesis

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Ambiental

Autoras

Angela Melissa Moran Suarez

Yesenia Judith Arias Salvador

Asesor

Dr. Sergio Eduardo Contreras Liza



Huacho - Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial – Sin Derivadas - Sin restricciones adicionales
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/
Reconocimiento: Debe otorgar el crédito correspondiente, proporcionar un enlace a la licencia e indicar si se realizaron cambios. Puede hacerlo de cualquier manera razonable, pero no de ninguna manera que sugiera que el licenciante lo respalda a usted o su uso. **No Comercial:** No puede utilizar el material con fines comerciales. **Sin Derivadas:** Si remezcla, transforma o construye sobre el material, no puede distribuir el material modificado. **Sin restricciones adicionales:** No puede aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros de hacer cualquier cosa que permita la licencia.

Facultad de Ingeniería Agraria, Industrias Alimentarias y Ambiental
Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental

METADATOS

DATOS DEL AUTOR (ES):		
NOMBRES Y APELLIDOS	**DNI**	**FECHA DE SUSENTACIÓN**
Angela Melissa Moran Suarez	75329997	8/05/2026
Yesenia Judith Arias Salvador	72976697	8/05/2026
DATOS DEL ASESOR:		
NOMBRES Y APELLIDOS	**DNI**	**CÓDIGO ORCID**
Dr. Sergio Eduardo Contreras Liza	08787108	https://orcid.org/0000-0002-6895-4332
DATOS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO - PREGRADO/POSGRADO-MAESTRIA-DOCTORADO:		
NOMBRES Y APELLIDOS	**DNI**	**CÓDIGO ORCID**
Mg. Eroncio Mendoza Nieto	06723932	https://orcid.org/0000-0002-4850-2777
Mg. Lucero Katherine Castro Tena	70837735	https://orcid.org/0000-0002-6770-8615
Mg. Tania Ivette Mendez Izquierdo	46925087	https://orcid.org/0000-0002-2473-4610

2026-020670 MORAN SUAREZ ANGELA MELISSA 20...

Efecto de metales pesados sobre una levadura psicrotolerante aislada de la laguna Shucshapa Oyón, Lima

UI-FIAIAYA PREGRADO 2026
Unidad de Investigación FIAIAYA-2026
Facultad de Ingenieria Agrarias, Industrias Alimentarias y Ambiental

Detalles del documento

Identificador de la entrega
trn:oid:::1:3509857314

Fecha de entrega
17 mar 2026, 2:20 p.m. GMT-5

Fecha de descarga
17 mar 2026, 2:23 p.m. GMT-5

Nombre del archivo
tesis_Melisa_y_Yesenia_04.02.2026.pdf

Tamaño del archivo
2.4 MB

77 páginas

17.651 palabras

103.154 caracteres

20% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Exclusiones

- N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

19% Fuentes de Internet
13% Publicaciones
10% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

DEDICATORIA

Dedico este logro a mis padres, por ser el cimiento de mi vida con su amor incondicional, esfuerzo y guía constante. A mi hija Alice, mi luz y mi mayor motivación, por inspirarme cada día a superarme. Este triunfo es también tuyo.

Angela Melissa Morán Suárez

Dedico esta tesis a mi hija Giorgina, razón de mi fortaleza y esperanza. A mi esposo Omar, por su amor, paciencia y apoyo incondicional en cada paso de este camino. Ustedes son mi impulso para seguir creciendo. Gracias por creer siempre en mí.

Yesenia Judith Arias Salvador

AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestro más profundo agradecimiento al Dr. Sergio Eduardo Contreras Liza, asesor de esta investigación, por su constante orientación, compromiso y valioso aporte en el diseño metodológico, procesamiento y análisis de datos. Su guía académica y científica fue fundamental en cada etapa del desarrollo de este estudio.

Extiendo también nuestra sincera gratitud a la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, en especial al Laboratorio de Biotecnología de la Producción, por brindar las instalaciones, recursos y apoyo técnico que hicieron posible la ejecución experimental de esta investigación.

De igual manera, agradecemos a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, particularmente al Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología, dirigido por el Blgo. Mg. Tito Libio Sánchez Rojas, por su valiosa colaboración en la identificación molecular de la levadura psicrotolerante, poniendo a disposición tecnología avanzada y asesoría especializada que enriquecieron significativamente este estudio.

Finalmente, deseo expresar un reconocimiento especial al Msc. Jean Piere Quiliche Duran, cuyo apoyo científico y técnico resultó decisivo en la ejecución de los ensayos experimentales, la interpretación de resultados y la consolidación de la presente investigación. Su compromiso y acompañamiento académico constituyeron un pilar fundamental para alcanzar los objetivos planteados en este trabajo.

A todos quienes contribuyeron de manera directa o indirecta a la culminación de este trabajo, les expreso mi reconocimiento y gratitud sincera.

ÍNDICE

Pág.

DEDICATORIA v

AGRADECIMIENTO vi

ÍNDICE vii

ÍNDICE DE TABLAS x

ÍNDICE DE FIGURAS xi

RESUMEN xiii

ABSTRACT xiv

INTRODUCCIÓN xv

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 10

1.1 Descripción de la realidad problemática 10

1.2 Formulación del problema 11

1.2.1 Problema general 11

1.2.2 Problemas específicos 12

1.3 Objetivos de la investigación 12

1.3.1 Objetivo general 12

1.3.2 Objetivos específicos 12

1.4 Justificación de la investigación 12

1.5 Delimitación del estudio 13

1.5.1 Delimitación espacial 13

1.5.2 Delimitación temporal 16

1.5.3 Delimitación teórica 16

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO 17

2.1 Antecedentes de la investigación 17

2.1.1 Antecedentes Internacionales 17

2.1.2 Antecedentes nacionales 18

2.2 Bases teóricas 19

2.2.1. Metales pesados y microrganismos 19
2.2.2 Biorremediación 25
2.3 Definición de términos básicos 26
2.4 Hipótesis de investigación 27
2.4.1 Hipótesis general 27
2.4.2 Hipótesis específicas 27
2.5 Operacionalización de variables 28
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA 29
3.1 Diseño Metodológico 29
3.1.1 Tipo de investigación 29
3.1.2 Nivel de investigación 29
3.1.3 Diseño 29
3.1.4 Enfoque 29
3.2 Población y muestra 30
3.2.1 Población 30
3.2.2 Muestra 30
3.3 Técnicas de recolección de datos 31
3.3.1 Protocolo de muestreo 31
3.3.2 Preparación del medio de cultivo 32
3.3.3 Aislamiento microbiológico 33
3.3.3 Caracterización morfológica, bioquímica y molecular 34
3.3.4 Conservación y activación 35
3.3.5 Optimización de crecimiento 36
3.3.6 Ensayo de tolerancia a metales pesados 36
3.3.7 Ensayo de crecimiento en medio líquido 37
3.4 Técnicas para el procesamiento de la información 37
CAPÍTULO IV: RESULTADOS 40

4.1 Análisis de resultados 40
4.1.1 Muestreo microbiológico 40
4.1.2 Aislamiento microbiológico 42
4.1.3 Caracterización morfológica y bioquímica 42
4.1.4 Optimización de crecimiento (efecto en la levadura) 44
Cinética de crecimiento 44
4.1.5 Ensayo de tolerancia a metales pesados (efecto en la levadura) 47
4.2 Contrastación de hipótesis 49
4.2.1 Efecto del mercurio 49
4.2.2 Efecto del Cadmio 51
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN 54
5.1 Discusión de resultados 54
CAPÍTULO VI: CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES 56
6.1 Conclusión 56
6.2 Recomendaciones 57
CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 59
ANEXOS 65
ANEXO 01. FICHA GENERAL DE RECOLECCIÓN DE MUESTRA 65
ANEXO 02. FICHA DE CADENA DE CUSTODIA DE MUESTRAS 66
ANEXO 03. Data y análisis estadístico 67
ANEXO 04. Galería fotográfica 68
ANEXO 05. Matriz de consistencia 70
ANEXO 06. Validaciones de juicios de expertos 71

ÍNDICE DE TABLAS

Pág:

Tabla 1 Matriz de Operacionalización de variables 28
Tabla 2 Ubicación georreferenciada de los puntos de muestreo en la Laguna Shucshapa. 32
Tabla 3 Concentraciones de metales pesados evaluadas sobre A. dulcitum, indicando las soluciones stock, los niveles de exposición y la concentración aproximada del inóculo.... 37
Tabla 4 Concentración de parámetros fisicoquímicos de la toma de muestra..... 41
Tabla 5 Aislamiento microbiológico para la evaluación de la cinética de crecimiento 45
Tabla 6 Crecimiento a diferentes temperaturas (°t) / 10 días 46
Tabla 7 Crecimiento a diferentes pH 46
Tabla 8 Ensayo de tolerancia a metales pesados 47
Tabla 9 Ensayo de metales pesados..... 48
Tabla 10 Contrastación de hipótesis de la investigación..... 49
Tabla 11 Prueba de normalidad de absorción de mercurio por A. dulcitum 50
Tabla 12 Resumen de la Prueba t-Student para muestras relacionadas para mercurio 51
Tabla 13 Prueba de normalidad de absorción de cadmio por A. dulcitum..... 52
Tabla 14 Resumen de la Prueba t-Student para muestras relacionadas para cadmio 52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación y distribución de los puntos de muestreo en la Laguna Shucshapa (Oyón, Lima). 15
Figura 2. Morfología y desarrollo de colonias. 21
Figura 3. Caracterización de bacterias aisladas por sitio de muestreo. 22
Figura 4. Cultivo de bacterias psicotolerantes. 23
Figura 5. Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos. 24
Figura 6. Zona de llegada a puntos de muestreo en la Laguna Shucshapa. 30
Figura 7. Preparación de medio de cultivo YPG medio líquido y sólido. 33
Figura 8. Aislamiento e incubación de levadura a 5°C en estático. 33
Figura 9. Realización de tinción con azul de metileno y Gram. 34
Figura 10. Preparación de medios de cultivo para pruebas bioquímicas. 35
Figura 11. Flujograma metodológico que describe las etapas clave de la investigación. .. 39
Figura 12. Observación de la levadura LS-L1 43
Figura 13. Resultado del alineamiento de la secuencia del ARN ribosomal de la subunidad grande (LSU rRNA). 44
Figura 14. Cinética de Crecimiento de Apiotrichum dulcitum a 25° por 10 días. 45
Figura 15. Registro de datos en SPSS de las concentraciones iniciales y finales de mercurio y cadmio en las muestras tratadas con la levadura *A. dulcitum*, utilizados para el análisis estadístico de reducción de metales pesados. 67
Figura 16. Pruebas de normalidad aplicadas a las concentraciones iniciales y finales de mercurio y cadmio en las muestras tratadas con *A. dulcitum.* 67
Figura 17. Diagramas de caja de las concentraciones iniciales y finales de cadmio y mercurio en las muestras tratadas con *A. dulcitum.* 67
Figura 18. Observación y caracterización morfológica de la levadura bajo microscopio óptico compuesto, efectuada por las tesistas como parte del proceso de identificación microbiológica. 68
Figura 19. Sales minerales utilizadas como fuente de metales pesados ($K_2Cr_2O_7$ para cromo, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ para cobre, $HgCl_2$ para mercurio y $CdCl_2 \cdot H_2O$ para cadmio), previo a la preparación del medio de cultivo YPG para los ensayos de tolerancia de la levadura *A. dulcitum* 68
Figura 20. Preparación del medio de cultivo YPG suplementado con cadmio para los ensayos de tolerancia de la levadura *A. dulcitum.* 69

Figura 21. Medición del peso húmedo de la biomasa de *A. dulcitum* tras el crecimiento en medio YPG suplementado con metales pesados, previo a la determinación del peso seco conforme a la metodología descrita. 69

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto de los metales pesados (cromo, cobre, mercurio y cadmio) sobre una levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa, ubicada en Oyón, Lima. **Metodología:** experimental de enfoque mixto y nivel descriptivo-explicativo, utilizando un diseño pre-experimental. Las muestras de agua fueron recolectadas en cinco puntos estratégicos y se incubaron en caldo YPG a 5 °C durante 20 días para el aislamiento microbiano. **Resultado:** La cepa obtenida fue caracterizada morfológica, bioquímica y molecularmente mediante secuenciación de ARN ribosomal y análisis BLASTn, identificándose como *Apiotrichum dulcitum* con un 99,66 % de similitud. Se evaluó su crecimiento en distintos rangos de temperatura (5 °C, 25 °C y 37 °C) y pH (3 a 13), identificando como óptimas las condiciones de 25 °C y pH 7–9. Para los ensayos de tolerancia a metales, se cultivó la levadura en medios líquidos suplementados con Cr^{6+} (100–500 ppm), Cu^{2+} (50–200 ppm), Hg^{2+} (30–100 ppm) y Cd^{2+} (50–200 ppm). El crecimiento fue monitoreado mediante absorbancia a 620 nm y biomasa seca. Los resultados mostraron que la cepa no fue tolerante al cromo hexavalente y solo presentó crecimiento limitado frente a cobre y mercurio en bajas concentraciones. En contraste, frente al cadmio se observó una reducción estadísticamente significativa de su concentración tras el cultivo ($p < 0,004$), lo que sugiere mecanismos de bioacumulación o biotransformación por parte de *A. dulcitum*. En el caso del mercurio, no se registró una disminución significativa ($p > 0,058$), lo que indica una limitada capacidad de remoción. **Conclusión:** *Apiotrichum dulcitum* posee potencial biotecnológico para la biorremediación de ambientes contaminados con cadmio, aunque su eficacia frente al mercurio es limitada.

Palabras clave: Levadura psicrotolerante, metales pesados, biorremediación, tolerancia microbiana

ABSTRACT

Objective: To determine the effect of heavy metals (chromium, copper, mercury, and cadmium) on a psychrotolerant yeast isolated from the Shucshapa Lagoon, located in Oyón, Lima. **Methodology:** An experimental study with a mixed approach and descriptive-explanatory level was conducted, employing a pre-experimental design. Water samples were collected from five strategic points and incubated in YPG broth at 5 °C for 20 days for microbial isolation. **Results:** The isolated strain was morphologically, biochemically, and molecularly characterized through ribosomal RNA sequencing and BLASTn analysis, identifying it as *Apiotrichum dulcitum* with 99.66% similarity. Its growth was evaluated at different temperature ranges (5 °C, 25 °C, and 37 °C) and pH levels (3 to 13), identifying optimal conditions at 25 °C and pH 7–9. For metal tolerance assays, the yeast was cultured in liquid media supplemented with Cr^{6+} (100–500 ppm), Cu^{2+} (50–200 ppm), Hg^{2+} (30–100 ppm), and Cd^{2+} (50–200 ppm). Growth was monitored by measuring absorbance at 620 nm and dry biomass. The results indicated that the strain was not tolerant to hexavalent chromium and showed limited growth in the presence of copper and mercury at low concentrations. In contrast, a statistically significant reduction in cadmium concentration was observed after cultivation ($p < 0.004$), suggesting possible bioaccumulation or biotransformation mechanisms by *A. dulcitum*. In the case of mercury, no significant reduction was observed ($p > 0.058$), indicating a limited detoxification capacity. **Conclusion:** *Apiotrichum dulcitum* exhibits biotechnological potential for the bioremediation of environments contaminated with cadmium, although its efficiency in mercury removal is limited.

Keywords: Psychrotolerant yeast, heavy metals, bioremediation, microbial tolerance.

INTRODUCCIÓN

El estudio se realizó con el propósito de evaluar la tolerancia y potencial biorremediador de la levadura *Apiotrichum dulcitum* (Berkhout) Yurkov & Boekhout, 2015 en presencia de cromo, cobre, mercurio y cadmio. En tal sentido, el objetivo principal fue determinar el efecto de estos metales pesados sobre la levadura psicrotolerante aislada en la laguna, con la finalidad de identificar su capacidad para la remoción de contaminantes y su posible aplicación en la mitigación de la contaminación ambiental.

El capítulo I presenta el planteamiento del problema, describiendo la problemática ambiental relacionada con la contaminación por metales pesados en cuerpos de agua. Asimismo, se incluye la formulación del problema, los objetivos de la investigación, la justificación del estudio y los alcances de su delimitación. Se plantearon interrogantes, tales como: ¿Cuáles son las características de la levadura *Apiotrichum dulcitum* aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima?, ¿Cuál es el efecto de metales pesados sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima?, ¿Cuál es el efecto de la concentración de metales pesados sobre la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima?

En el capítulo II, correspondiente al marco teórico, se presentan antecedentes de investigación sobre microorganismos metalotolerantes, bases teóricas sobre contaminación por metales pesados, biorremediación y levaduras psicrotolerantes. Se definen términos clave y se formulan las hipótesis del estudio. Las variables de investigación fueron: variable independiente: metales pesados (Cr^{6+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Cd^{2+}) y variable dependiente: crecimiento y tolerancia de *Apiotrichum dulcitum*.

El capítulo III describe la metodología empleada, enmarcada en una investigación de tipo aplicada, de nivel explicativo y con un diseño experimental. Se detallan las técnicas de recolección de datos, que incluyeron el aislamiento y caracterización de la levadura, pruebas de tolerancia a metales pesados y análisis de crecimiento en diferentes condiciones. Se utilizó el software IBM SPSS Statistics 25 para el análisis estadístico, aplicando pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y la prueba t-Student para muestras relacionadas, con un nivel de confianza del 95%.

En el capítulo IV, se presentan los resultados, incluyendo la caracterización morfológica y bioquímica de *A. dulcitum*, su crecimiento en distintos valores de pH y temperatura, y su tolerancia diferencial a metales pesados. Los datos estadísticos muestran que *A. dulcitum*

logró reducir significativamente la concentración de cadmio en el medio de cultivo, pero no mostró una disminución significativa en la concentración de mercurio.

El capítulo V comprende la discusión de los resultados, comparando los hallazgos con investigaciones previas sobre microorganismos biorremediadores y evaluando la viabilidad de *A. dulcitum* como organismo biotecnológico para la restauración de entornos afectados con metales pesados.

En el capítulo VI, se exponen las conclusiones y recomendaciones, destacando la capacidad de *A. dulcitum* para tolerar y reducir la concentración de cadmio, mientras que su efecto sobre otros metales, como mercurio, fue limitado. Se recomienda realizar estudios a nivel molecular para determinar los mecanismos de resistencia involucrados y evaluar su aplicación en sistemas de biorremediación a escala piloto.

El capítulo VII presenta las referencias bibliográficas, que incluyen fuentes científicas nacionales e internacionales utilizadas en el estudio, tales como artículos de revistas indexadas, tesis, informes ambientales y publicaciones especializadas en microbiología ambiental y biotecnología.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

La existencia de metales pesados constituye actualmente uno de los problemas ambientales más relevantes a nivel mundial debido a su persistencia, bioacumulación y toxicidad. Estos elementos impactan directamente en cuerpos de agua, suelos y zonas agrícolas, principalmente como consecuencia del acelerado crecimiento industrial y el uso intensivo de agroquímicos (Zhang *et al*., 2019). Su peligrosidad radica en que pueden movilizarse y transferirse a lo largo de la cadena alimentaria, generando efectos adversos en la salud humana, incluso a niveles reducidos (Ma *et al*., 2020). Por ello, el análisis de metales pesados disueltos en fuentes hídricas se vuelve esencial para detectar cambios en las características del agua y determinar si la contaminación proviene de descargas industriales o actividades mineras que liberan metales directamente al ecosistema (Barman *et al*., 2020).

En el contexto peruano, el grado de contacto a metales pesados vinculada a la actividad minera es considerada uno de los riesgos ambientales y sanitarios más graves, afectando de manera especial a poblaciones altoandinas. Investigaciones en zonas mineras han evidenciado elevados niveles de Pb, As y Cd en la sangre de niños que viven cerca de centros de explotación, desencadenando alteraciones neurotóxicas, dermatológicas y respiratorias asociadas a intoxicación crónica (Fandiño *et al*., 2021). Estos resultados reflejan una problemática persistente de salud pública en regiones donde la explotación metálica es intensa y donde la exposición prolongada compromete seriamente el desarrollo físico, cognitivo y la calidad de vida.

A nivel del Perú, la degradación por metales pesados en sistemas hídricos se ha consolidado como una problemática ambiental de especial relevancia, particularmente en la región andina y, con mayor énfasis, en las regiones centrales del país. En esta área, que comprende departamentos como Junín y cuencas estratégicas asociadas al río Mantaro, la presión ejercida por actividades antrópicas es significativa. La minería metálica, la agricultura intensiva, la acuicultura continental, los vertimientos de aguas residuales urbanas y determinadas actividades industriales han contribuido de manera sostenida a la liberación de elementos potencialmente tóxicos hacia los cuerpos de agua. Estos metales tienden a concentrarse en los sedimentos, los cuales funcionan como reservorios ambientales capaces de movilizar contaminantes hacia la columna de agua bajo determinadas condiciones fisicoquímicas, incrementando su biodisponibilidad y el riesgo de bioacumulación en organismos acuáticos. En ecosistemas altoandinos, esta situación resulta especialmente

crítica debido a su alta fragilidad ecológica y a la dependencia directa de las poblaciones locales de estos recursos hídricos para consumo humano, riego y actividades productivas. Investigaciones desarrolladas en ríos de la región central del Perú han reportado la existencia de metales como mercurio, zinc y plomo en sedimentos superficiales, evidenciando riesgos ecológicos potenciales que, aunque en algunos casos sean catalogados como bajos, no deben ser subestimados por su carácter persistente y acumulativo en el ambiente (Custodio *et al*., 2024).

Dentro de estos ambientes contaminados destacan los microorganismos metalotolerantes, un grupo de extremófilos capaces de sobrevivir y adaptarse a condiciones con concentraciones elevadas de metales como As, Cd, cobre y zinc (Jha & Barman, 2021). Estos microorganismos poseen mecanismos especializados de resistencia que incluyen procesos de adsorción, precipitación, oxidación, reducción y transformación química, permitiéndoles atenuar la toxicidad del entorno (Igiri *et al*., 2018; Zeng *et al*., 2020). Como resultado, múltiples especies de bacterias, hongos y levaduras han desarrollado capacidades evolutivas que les permiten resistir exposiciones prolongadas a metales pesados, convirtiéndose en potenciales herramientas para la biorremediación (Chibuike y Obiora, 2014; Das *et al*., 2016; Fashola *et al*., 2016).

La Laguna Shucshapa, ubicada en el distrito de Oyón, departamento de Lima, y perteneciente a la cuenca del río Huaura, constituye un ecosistema representativo de este tipo de problemáticas. Los centros poblados de la zona, situados alrededor de los 4600 m s. n. m., mantienen como actividades económicas principales la minería y el turismo, destacando este último por la conocida ruta de baños termales. Estudios sobre la calidad del agua en la cuenca del río Huaura muestran variaciones térmicas anuales, con promedios cercanos a los 5,8 °C, valores que pueden verse afectados por alteraciones en la calidad del agua (ANA, 2014). Asimismo, se ha reportado que la laguna Shucshapa presenta contaminación por metales pesados como consecuencia directa de actividades mineras colindantes y relacionadas (Olivares, 2012).

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuál es el efecto de metales pesados (cromo, cobre, mercurio y cadmio) sobre la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Cómo es el aislamiento y caracterización de la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima?
- ¿Cuál es el efecto de metales pesados sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima?
- ¿Cuál es el efecto de la concentración de metales pesados sobre la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Determinar el efecto de metales pesados (cromo, cobre, mercurio y cadmio) sobre la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima

1.3.2 Objetivos específicos

- Describir el aislamiento y caracterización de la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima
- Determinar el efecto de metales pesados sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima.
- Determinar el efecto de la concentración de metales pesados sobre la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima.

1.4 Justificación de la investigación

La contaminación por metales pesados generada por la minería tradicional en Perú, afecta cuerpos de agua altoandinos y su biodiversidad. Los métodos convencionales de remediación suelen ser costosos y poco sostenibles, por lo que el uso de microorganismos metalotolerantes se presenta como una opción eficiente para la remover estos contaminantes. Sin embargo, la identificación de estos organismos en ambientes de baja temperatura sigue siendo un desafío. Esta investigación busca aislar y caracterizar levaduras psicrotolerantes con capacidad de biorremediación, contribuyendo al desarrollo de estrategias biotecnológicas sostenibles aplicables en la industria minera. Además, permitirá ampliar el conocimiento sobre la diversidad microbiana en ecosistemas altoandinos, proporcionando bases científicas para la restauración de entornos afectados por metales pesados.

1.5 Delimitación del estudio

1.5.1 Delimitación espacial

La Laguna Shucshapa se localiza en el distrito y provincia de Oyón, dentro del departamento de Lima, Perú, en una zona altoandina correspondiente a la región ecológica Jalca o Suni. Esta laguna constituye un ecosistema representativo de los Andes centrales, caracterizado por un entorno montañoso, temperaturas frías, baja presión atmosférica y vegetación adaptada a condiciones climáticas extremas. La presencia de cuerpos de agua como la Laguna Shucshapa es fundamental para la biodiversidad local y constituye un punto estratégico de referencia ambiental en el contexto regional, debido a su importancia ecológica, hídrica y paisajística.

Para garantizar una adecuada georreferenciación de los sitios de estudio, se empleó el sistema de coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator), Zona 18 Sur, con el datum geodésico WGS 84 (World Geodetic System 1984), ampliamente reconocido a nivel internacional por su precisión y aplicabilidad en estudios de carácter geoespacial. Este sistema permitió identificar con exactitud la posición de cada punto de muestreo, facilitando la posterior representación cartográfica y el análisis de la distribución espacial de las muestras obtenidas en el entorno lagunar. Las coordenadas registradas mediante dispositivos GPS de precisión media se ubicaron dentro del rango de 308611.4 a 3308617.2 metros Este (X) y 8838411 a 8838426 metros Norte (Y), abarcando los sectores de interés definidos para el presente estudio.

El Mapa de Puntos de Muestreo (Figura 1) fue elaborado mediante el software libre QGIS versión 3.34 “Prizren”, el cual permitió integrar tanto las capas base topográficas del Instituto Geográfico Nacional (IGN) del Perú como los datos recolectados en campo. En la construcción del mapa se consideraron todos los elementos mínimos recomendados para garantizar la calidad cartográfica y facilitar su interpretación: se incluyó un título descriptivo, un recuadro de leyenda, una flecha de orientación norte, una escala gráfica de 1:50,000, y coordenadas UTM rotuladas en los bordes del mapa. Además, se añadieron curvas de nivel cada 50 metros, así como los límites distritales y cuerpos de agua adyacentes, para una mejor contextualización geográfica.

Durante el trabajo de campo, se establecieron puntos estratégicos de muestreo tanto en la periferia como en la zona central de la laguna, seleccionados en función de la profundidad, orientación cardinal y presencia de afluentes o aportes superficiales. A continuación, se

detallan los puntos de muestreo georreferenciados con coordenadas reales en el sistema UTM:

- Punto de Muestreo 1 (P1): 308615.8 m E / 8838426 m N – Altitud: 4283.8 m s. n. m. (borde noreste de la laguna, área de ingreso).
- Punto de Muestreo 2 (P2): 308613.7 m E / 8838419 m N – Altitud: 4283.8 m s. n. m. (zona central del espejo de agua).
- Punto de Muestreo 3 (P3): 308611.4 m E / 8838425 m N – Altitud: 4283.8 m s. n. m. (borde noroeste de la laguna, cercana a descarga superficial).
- Punto de Muestreo 4 (P4): 308612.9 m E / 8838411 m N – Altitud: 4283.8 m.s.n.m. (borde suroeste de la laguna).
- Punto de Muestreo 5(P5): 308617.2 m E / 8838413 m M – Altitud: 4283.8 m.s.n.m. (borde sureste de la laguna)

Estos datos fueron obtenidos utilizando un GPS Garmin Rino 110, con una precisión estimada de ±5 metros. La altitud fue validada utilizando curvas de nivel de 50 metros generadas con datos del IGN Perú. Esta información permitió construir una base geoespacial robusta y confiable para sustentar los análisis posteriores del comportamiento ecológico y la tolerancia de la levadura psicrotolerante frente a metales pesados en los diversos puntos de la laguna.

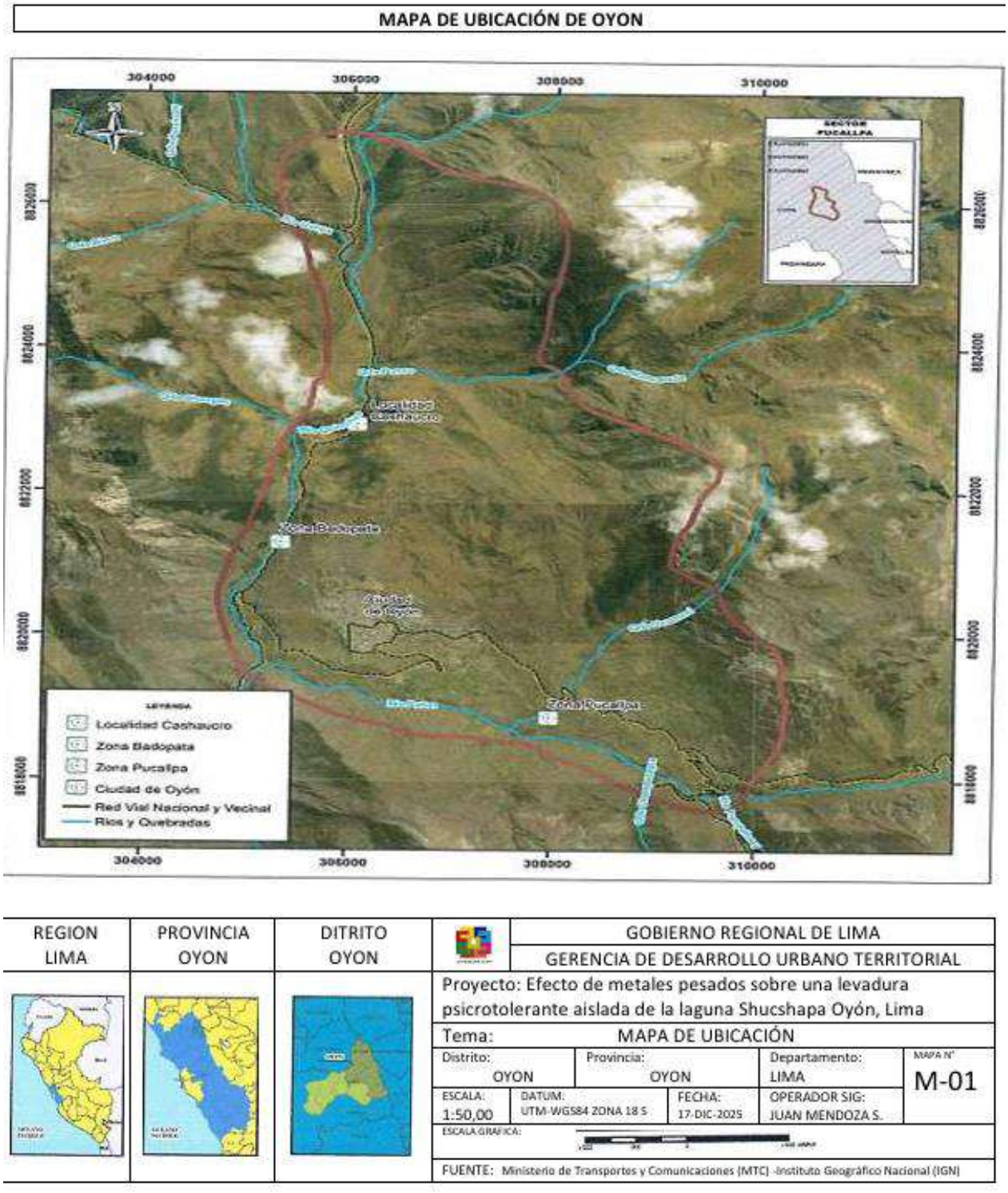


Figura 1. Mapa de ubicación y distribución de los puntos de muestreo en la Laguna Shucshapa (Oyón, Lima).

Nota: Georreferenciados en coordenadas UTM (zona 18S), mostrando la posición relativa del área de estudio y los sitios seleccionados para el análisis de agua.

1.5.2 Delimitación temporal

El estudio se desarrolló entre los meses enero a diciembre de 2024, periodo en el que se recolectaron muestras en la Laguna Shucshapa, Oyón, Lima, seguido del aislamiento, caracterización y evaluación de la levadura psicrotolerante en laboratorio. También se realizaron experimentos para analizar su margen aceptable a los metales pesados, junto con el procesamiento de datos y la elaboración del informe final. El plazo fue definido considerando la disponibilidad de recursos, el tiempo requerido para los ensayos y la validación de resultados.

1.5.3 Delimitación teórica

El estudio se centra en el aislamiento y caracterización de levaduras psicrotolerantes con la finalidad de evaluar su potencial en futuros procesos de biorremediación de metales pesados en condiciones de bajas temperaturas. Este estudio se fundamenta en los principios de la microbiología ambiental y la biotecnología aplicada a la remoción de metales pesados, considerando los mecanismos de tolerancia y detoxificación desarrollados por microorganismos en ambientes extremos. Además, se basa en estudios previos sobre la capacidad de levaduras para la biosorción y biotransformación de metales, así como en la caracterización molecular y fisiológica de especies con potencial biotecnológico en procesos de remediación ambiental.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

2.1.1 Antecedentes Internacionales

Wang *et al*. (2023), aislaron y seleccionaron bacterias nativas con capacidad de adaptación a metales pesados de minas y las utilizaron de una manera ecológica y eficiente en la reparación del suelo contaminado por metales en Laoyaling tailings en la ciudad Tongling, provincia Anhui, China. Encontraron entre los microrganismos aislado que la bacteria cepa K1 *Pseudomonas aeruginosa* secuenciada con 16S rDNA disminuyó significativamente los metales pesados como cadmio y cobre.

Sen, *et al*. (2022), analizaron y aislaron microrganismos de cuerpos de agua del Canal Tollygunge ubicado en Kolkata West Bengal India, siendo estos: 35 cepas de bacterias, 10 de levadura y 5 de hongos filamentosos. Encontraron y aislaron mediante análisis bioquímico, filogenético el microrganismo con mayor capacidad de tolerancia a sales de metales pesados y contaminantes no metálicos de muestras de agua residual y con la más eficiente capacidad de remover tóxicos, sales de Pb, Ni, Cu, Cd, Fe, As; de los cuerpos de agua contaminados, este microrganismo fue la levadura *Candida tropicalis* JIC MZ798901.

Majhi *et al.* (2021), aislaron bacterias tolerantes a cobre (CTB) de varias minas de cobre ubicadas al este de la ciudad de East Singhbhum, ubicada en el estado de Jharkhand en India, zona considerada como el cinturón de cobre y de ricos recursos minerales como hierro, oro, níquel, cianita y uranio (Giri y Singh 2017), con el propósito de seleccionar una cepa bacteriana nativas tolerante a cobre y cadmio del suelo de los relaves. Estudiaron los mecanismos de los procesos de regulación de la tolerancia al cobre aliviando los efectos tóxicos y su benéficos como promotoras de crecimiento de plantas en ambientes con condiciones de stress por la presencia de metales. Entre los microrganismos estuvieron *Bacillus zanthoxyli* cepa 1433, *Bacillus stercoris* cepa JCM 30051 y *Pseudomonas alcaliphila* cepa JCM 10630. Determinaron la concentración máxima tolerable (MTC) seguida de la caracterización filogenética de los aislados.

Martínez, *et al.* (2021), exploraron el impacto de metales pesados en microorganismos aislados en el cuerpo de agua léntico Alalay en Cochabamba, Bolivia. En este estudio, aislaron y caracterizaron 18 cepas de bacterias, 8 de levadura y 7 hongos filamentosos. Utilizando métodos bioquímicos y análisis genético, identificaron que la levadura *Pichia kudriavzevii* LAM8432 presentaba una elevada capacidad para tolerar y remover níquel (Ni)

y arsénico (As). Esta levadura demostró una eficiencia significativa en la reducción de contaminantes metálicos en condiciones controladas, lo que subraya su aplicación en procesos de biorremediación.

Huang, *et al.* (2020), realizaron un estudio en cuerpos de agua del río Yangtze, en la provincia de Hubei, China, donde lograron aislar y analizar microorganismos psicrotolerantes resistentes a metales pesados en ambientes acuáticos contaminados. En total, se aislaron 24 cepas de bacterias, 12 de levadura y 6 de hongos filamentosos. Mediante análisis filogenéticos y bioquímicos, encontraron que la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* HM4500 mostró una alta capacidad de tolerancia a concentraciones elevadas de Cd, Pb y Cu, siendo especialmente efectiva en la remoción de estos metales de aguas residuales.

2.1.2 Antecedentes nacionales

Sánchez-Rojas *et al.* (2023) aislaron y caracterizaron microorganismos, entre ellos *Yarrowia lipolytica*, de lagunas altoandinas peruanas afectadas por residuos mineros. Se identificaron 18 cepas de levadura con capacidad de adaptación y biosorción de metales pesados, principalmente Pb, Cd y Cu, mediante análisis bioquímicos y genéticos. Los resultados sugieren el potencial de estas cepas en la biorremediación de aguas contaminadas, destacando la relevancia de la levadura *Y. lipolytica* como una opción prometedora para disminuir la concentración de metales tóxicos en ambientes acuáticos.

Rivera (2021) analizó la concentración de metales totales disueltos en la Laguna de Patón, Oyón, Lima, mediante el análisis de muestras superficiales en cuatro puntos durante las temporadas de avenida y estiaje. Utilizando Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS, EPA 200.8), identificó As, Pb y zinc, considerados contaminantes según los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para el agua. Los resultados mostraron que el plomo (Pb) superó los límites permitidos, coincidiendo con la Autoridad Nacional del Agua (ANA, 2013), que atribuyó la contaminación al vertimiento de aguas residuales mineras y a la disolución de formaciones geológicas en la cuenca del río Huaura.

Piñeiro et al. (2021) elaboraron un informe sobre los efectos adversos de la degradación por metales pesados en la salud de la población de Cerro de Pasco, Perú. Debido a las emisiones metalúrgicas, estudios previos han reportado niveles alarmantes de Pb en sangre en niños residentes de la zona, con concentraciones superiores a 10 µg/dL, un valor preocupante para

la salud pública. El plomo, clasificado como cancerígeno, es considerado el segundo metal pesado más tóxico después del As.

Arrieta (2021) evaluó la biosorción de hongos filamentosos aislados en sistemas acuáticos altoandinos afectados por residuos mineros en la región central del Perú. En el estudio, se analizaron 20 cepas, determinando su eficacia en la remoción de metales pesados como arsénico, mercurio y Cr mediante ensayos experimentales. Los resultados indicaron que algunas especies poseen alta capacidad de retención de metales, resaltando su potencial uso en biorremediación para reducir la contaminación en zonas impactadas por la minería.

Muñoz-Silva *et al.* (2019) señalan que la minería es una de las actividades más relevantes económicamente en el Perú, es considerada la industria más desarrollada en América Latina (BBVA Research, 2019). En un estudio realizado en la carga ambiental residual minero de Santa Rosa de Jangas, se identificó una microflora compuesta por hongos y bacterias con capacidades de adaptación y tolerancia a metales pesados, lo que sugiere su potencial en biorremediación y biotecnología ambiental. Entre los hongos analizados, *Fusarium temperatum* mostró resistencia a plomo (Pb^{2+}) y zinc (Zn^{2+}), *Fusarium oxysporum* a níquel, cadmio y plata (Ni^{2+}, Cd^{2+} y Ag^{1+}), *Fusarium inflexum* a cobre (Cu^{2+}) y *Penicillium vanluykii* a cromo (Cr^{6+}). Asimismo, se identificaron bacterias con alta tolerancia a metales, como *Bacillus licheniformis* resistente a cadmio, níquel y zinc (Cd^{2+}, Ni^{2+} y Zn^{2+}), *Bacillus subtilis* a plomo (Pb^{2+}), *Serratia sp.* a cobre y plata (Cu^{2+} y Ag^{1+}), y *Bacillus cereus* a cromo (Cr^{6+}).

2.2 Bases teóricas

2.2.1. Metales pesados y microrganismos

Los metales pesados por alta densidad que, incluso en concentraciones mínimas, pueden ser tóxicos para los organismos biológicos y representar un riesgo ambiental significativo (Ali et al., 2019). Entre los más comunes se encuentran cadmio, plomo, mercurio y arsénico, los cuales tienden a acumularse en los tejidos de plantas, animales y humanos, afectando la salud a largo plazo (Tchounwou *et al.,* 2012). Su toxicidad radica en su capacidad para alterar funciones biológicas esenciales, como la actividad enzimática y el estrés oxidativo, lo que puede provocar daño celular y enfermedades crónicas (Jaishankar *et al.*, 2014). Además, su dispersión en el ambiente es facilitada por actividades humanas como la minería, la industria y el uso de fertilizantes, lo que subraya la necesidad de implementar estrategias efectivas de remoción y mitigación (Fu y Wang, 2011).

2.2.1.1 Contaminación

Constituye un riesgo significativo para el medio ambiente y la salud humana, ya que su acumulación en cuerpos de agua los transforma en fuentes de contaminación. Entre sus principales fuentes se encuentran la escorrentía minera, la actividad industrial y los residuos generados por el consumo humano. Además, los metales pesados en su estado soluble poseen una mayor movilidad en el suelo, lo que facilita su absorción por las plantas, aumentando así el riesgo de bioacumulación en los ecosistemas. Es importante determinar las zonas con mayor contaminación por metales pesados para tratar el problema ambiental. Cerro de Pasco es una de las ciudades de Perú que se ha contaminado excesivamente por metales pesados como Al, Sb, As, Cd, Cr, Fe, Pb, Sn y Tl; debido a la alta actividad minera en la región, siendo está expuesta a una mina a cielo abierto (regiones Paragsha, Carhuamayo) (Pinheiro *et al*., 2021).

2.2.1.2 Principales consecuencias a la salud

La exposición prolongada a metales pesados tiene efectos perjudiciales en la salud humana, impactando distintos órganos y sistemas. Un estudio realizado en 2016 y 2018 analizó muestras de cabello en niños, evidenciando altas concentraciones de metales tóxicos, con mayores niveles en la punta del cabello, lo que indica una exposición sostenida. Asimismo, se identificó una asociación entre la presencia de estos metales pesados y un incremento en el riesgo de síntomas como sangrados nasales, cólicos persistentes, afecciones cutáneas, alteraciones en el estado de ánimo, aparición de líneas blancas en las uñas y disminución del campo visual, entre otros efectos adversos. Frente a estos impactos, resulta crucial implementar estrategias preventivas, como la instalación de barreras de contención en zonas mineras, con el objetivo de minimizar la exposición de las comunidades cercanas (Pinheiro *et al*., 2021).

2.2.1.3 Microorganismos metalotolerantes

Estos microorganismos tienen la capacidad de adaptarse y prosperar en entornos con altas concentraciones de metales pesados, que en condiciones normales serían tóxicas para la mayoría de los organismos vivos (Gadd, 2010). Para ello, han desarrollado mecanismos bioquímicos y genéticos que les permiten resistir, transformar o eliminar estos contaminantes, facilitando su aplicación en biorremediación (Hussein *et al.,* 2005). Entre los metales más comunes a los que presentan tolerancia se encuentran

Pb, Cd, Zn y Cu (Valls & Lorenzo, 2002). Su importancia radica en su capacidad para minimizar la toxicidad ambiental de estos elementos (Wang y Chen, 2009). Para enfrentar la presencia de metales pesados, emplean diversos mecanismos, como la biosorción, donde los metales se fijan a la superficie celular sin internalización activa (Gadd, 2010), la bioacumulación, en la que los metales se almacenan en compartimentos celulares específicos para evitar daños (Baker-Austin et al., 2006), y la biotransformación, que convierte los metales en formas menos tóxicas mediante reacciones bioquímicas (Hussein *et al.,* 2005).

Algunos ejemplos de microrganismos metalotolerantes: *Ferroplasma sp*., *Cupriavidus metallidurans*, bacterias del suelo, como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter, Micrococcus, Hafnia, Gemella, Nocardia* y *Deinococcus* (Bensidhoum et al., 2016; Xia et al., 2019; Zhao et al., 2017). Se encontraron los microrganismos con capacidad de ser metalotolerantes *Fusarium temperatum* metalotolerante a Pb^{+2}, *Fusarium temperatum* metalotolerante a Zn^{+2}, *Fusarium oxysporum* metalotolerante a Cd^{+2} y Ni^{+2}, *Fusarium oxysporum* metalotolerante a Ag+1, *Fusarium inflexum* metalotolerante a Cu^{+2} y *Penicillium vanluykii* metalotolerante a Cr^{+6}. Las cepas de bacterias con mayores índices de tolerancia fueron *Bacillus licheniformis* SSR18 a Ni^{+2}, Cd^{+2}y Zn^{+2}, *Bacillus subtilis* SSR3 a Pb^{+2}, *Serratia sp.* SSR15 a Cu+2, *Serratia sp.* SSR13 a Ag^{+1} y *Bacillus cereus* SSR01 a Cr^{+6} y encontraron que los hongos presentaron mejores índices de adaptación que las bacterias. (Muñoz – Silva *et al*., 2019).

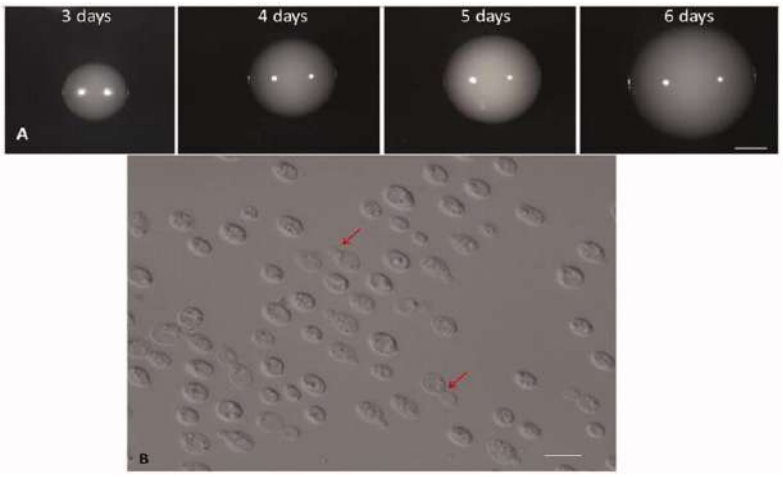


Figura 2. Morfología y desarrollo de colonias.

Nota: (A) Desarrollo de colonias cultivadas en caldo YM de 3 a 6 días de edad. Barra, 1 mm. (B) Células en gemación de Papiliotrema Huenov cultivadas en caldo YM durante 3 días a 25 °C. Las flechas rojas indican los sitios de gemación. Barra, 10 µm (Nguyen *et al*., 2020).

Una vez que el consorcio aclimatado de cada cola minera creció en 20 mg/L, se realizó un recrecimiento en agar extracto de levadura peptona en placas con 50 mg/L de cada metal a aislar para luego identificarlo. Se aislaron tres cepas metalotolerantes de la cola minera SFJ y tres de NG. Los resultados de la identificación del nombre de la cepa, la tinción de Gram y el fenotipo de cada aislado se muestran en la Figura 3. Las bacterias SFJ predominaron en grampositivas, mientras que las NG predominaron en gramnegativas. Además, SFJ exhibió más morfología de cocos, mientras que NG tuvo más bacilos.

relaves mineros	Identificación del nombre de la cepa	Tinción de Gram y formación de bacterias	Color del fenotipo	Imagen
SFJ	SFJ02	cocos grampositivos	Marrón claro	
	SF008	bacilos grampositivos	Amarillo	
	SFJ09	Cocos grampositivos	De color claro	
NG	NG01	bacilos gramnegativos	De color claro	
	NG02	cocos grampositivos	Marrón claro	
	NG06	bacilos gramnegativos	Amarillo	

Figura 3 Caracterización de bacterias aisladas por sitio de muestreo.

Nota: Parades-Aguilar, J., Calderón, K., Agustin-Salazar, S., Cerruti, P., Ambrogi, V., Gámez-Meza, N., y Medina-Juárez, L. A. (2024). Isolation and identification of metallotolerant bacteria with a potential biotechnological application. *Scientific Reports, 14*(1), 3663. DOI: 10.1038/s41598-024-54090-0

2.2.1.4 Microorganismos psicrotolerante

Las levaduras psicrotolerantes son microorganismos capaces de crecer en temperaturas cercanas a 0 °C, aunque su temperatura ideal de crecimiento generalmente se sitúa entre 20 °C y 40 °C (ver Figura 4). Esta adaptabilidad les permite habitar en ambientes fríos como regiones polares, aguas profundas y áreas de alta montaña (Chaturvedi *et al*., 2020; Fonseca *et al*., 2019). A diferencia de las levaduras psicrófilas, cuya temperatura adecuada de crecimiento es de 15 °C o inferior, las psicrotolerantes pueden desarrollarse en un rango térmico más amplio, confiriéndoles una mayor versatilidad ecológica (Margesin y Schinner, 2020).

Las levaduras psicrotolerantes presentan adaptaciones fisiológicas y bioquímicas que les permiten sobrevivir y proliferar en condiciones de bajas temperaturas. Entre estas adaptaciones se encuentran la generación de enzimas activas a mínimas temperaturas, la modificación de la composición lipídica de sus membranas para mantener la fluidez y la síntesis de proteínas de choque frío que protegen la estructura celular (Buzzini y Margesin, 2014). Estas características permiten a estas levaduras mantener la actividad metabólica en condiciones adversas, contribuyendo a su supervivencia en ecosistemas fríos (Fonseca *et al.*, 2019; Margesin y Schinner, 2020).

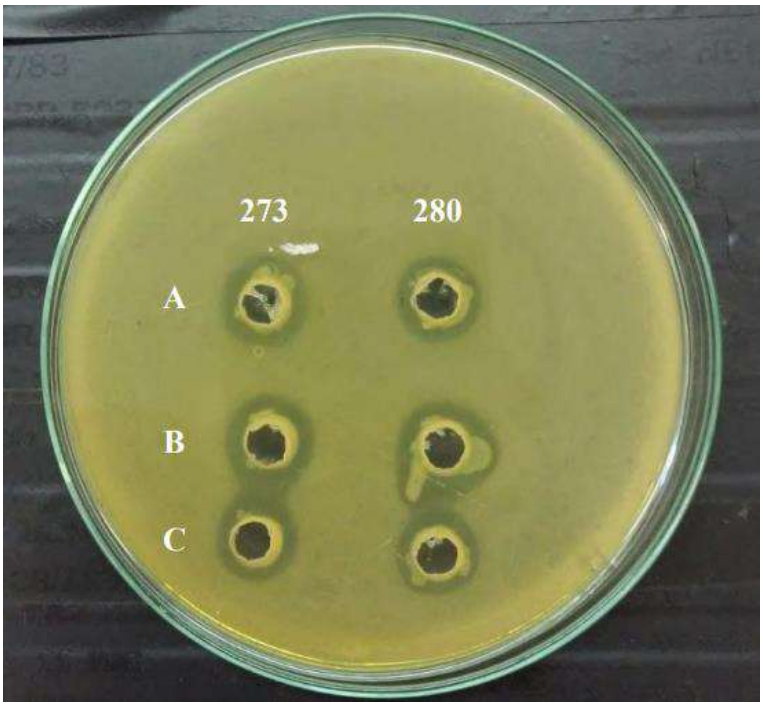


Figura 4. Cultivo de bacterias psicotolerantes.

Nota: Bacteria indicadora *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, junto con (A) cultivo bacteriano de las bacterias psicrotolerantes productoras de sustancias antimicrobianas, (B) cultivo bacteriano con la adición de NaOH 0,1 N y (C) cultivo bacteriano con la adición de proteasa a 5 mg/mL. Obtenido de: Mederos da Silveira, S. (2018). Obtenido de: https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/19384/1/SMSilveira.pdf

2.2.1.5 Mecanismos de respuesta fisiológicos a metales pesados

Diversos microorganismos, como bacterias, levaduras y hongos, pueden acumular iones metálicos de cuerpos de agua contaminados a través de adsorción superficial o penetración intracelular. Algunos sintetizan compuestos quelantes que inmovilizan metales pesados y los transforman en compuestos volátiles, facilitando su eliminación. Especies como *Sphaerotilus leptothrix* y *Polymorphum hypomicrobium* pueden incrustar manganeso, *Gallionella* acumula hierro, y *Pedomicribium* encapsula oro en su estructura (ver Figura 5). La metilación es otro mecanismo clave, donde los metales como Hg, Se, Arsénico, Sn, Plomo y Cd se transforman en compuestos volátiles. Se han identificado procesos similares en Pt, Pa, Au y Ta, facilitando su eliminación. Además, proteínas como la metallotioneína regulan la unión y detoxificación de metales pesados, destacando el potencial de estos microorganismos en procesos de biorremediación (Gutiérrez y Ballester, 2002).

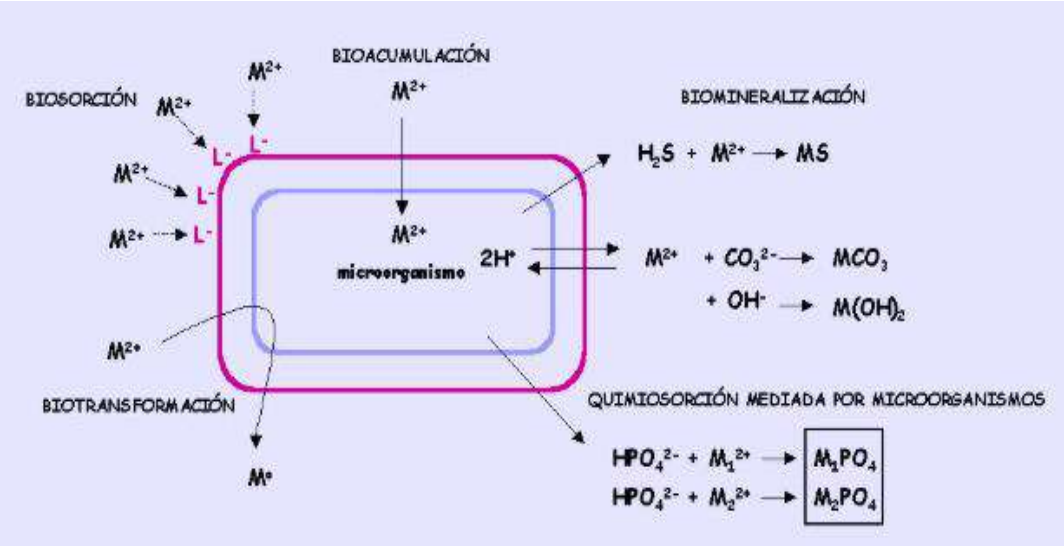


Figura 5. Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos.

Nota: Obtenido de Química Viva. (2003). *Metales pesados y su impacto ambiental*. http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm

2.2.2 Biorremediación

La biorremediación está ganando cada vez más importancia debido a su bajo costo, simplicidad y mayor eficiencia (Wei *et al.* 2014; Singh *et al.* 2017). El tratamiento de cuerpos de agua con métodos convencionales que incluyen tratamiento de aguas residuales, precipitación química, tratamiento electroquímico e intercambio iónico son extremadamente costoso y afectan negativamente la actividad biológica, la estructura del ambiente y la fertilidad (Gupta *et al.* 2016).

2.2.2.1 Técnicas moleculares en levaduras

El aislamiento y caracterización de microorganismos responsables de la biorremediación es fundamental; sin embargo, los métodos convencionales solo permiten cultivar entre 0,1 y 1% de la comunidad microbiana del suelo, dejando más del 99% inaccesible. Para superar esta limitación, se emplean técnicas moleculares que permiten explorar microorganismos no cultivables (Gupta *et al*., 2020; Subhashini *et al.,* 2017). Asimismo, la ingeniería genética se ha establecido como una estrategia fundamental en el desarrollo de levaduras con capacidad biorremediadora, proporcionando una alternativa eficaz y económica para la remisió de metales pesados, en contraste con los métodos convencionales.

La patente de Le-Le Sun y Belcher (2020) menciona la creación de una levadura modificada genéticamente como método de biorremediación al consumir metales pesados de cuerpos de agua para eliminar estos. Presenta tres técnicas desarrolladas para eliminar los desechos de metales pesados, que incluyen la visualización de proteínas de unión a metales en la superficie celular, la captación celular para capturar metales y la biomineralización. La primera utiliza una proteína de fusión secretada de glutamina sintetasa (GS) y metalotioneínas (MT). GS tiene una capacidad única para formar andamios complejos en presencia de metales divalentes. Las metalotioneínas MT son proteínas de origen vegetal que tienen capacidades específicas de unión a metales. Cuando estas proteínas se secretan como una proteína de fusión junto con la superficie de levadura que expresa GS, se unen de manera eficiente a los metales pesados en solución y forman densos agregados de levadura y metal que se eliminan fácilmente del agua. La segunda estrategia de remediación de metales utiliza la captación directa de metales en la levadura mediante transportadores de metales transmembrana. Generaron transportador de metales de levadura SMF1 con éxito que capta cadmio, plomo y estroncio de manera específica

y eficiente. La última técnica de biorremediación es la biomineralización de metales. El azufre es un elemento reactivo que puede reaccionar con iones metálicos para formar sulfuros metálicos inertes y se ha utilizado en la precipitación química industrial, sin embargo, la volatilidad del azufre hace que su almacenamiento sea peligroso. El azufre es un elemento indispensable para la vida, y se requieren vías bioquímicas de asimilación de azufre para producir aminoácidos sulfurosos. Diseñaron una levadura con un bloqueo estratégico en una ruta de asimilación de azufre que conduce a la acumulación de azufre, levaduras productoras de azufre eficientes en la precipitación de cobre, cadmio, zinc, mercurio y plomo en agregados densos en la membrana celular de la levadura. Juntas, estas tecnologías proporcionan una amplia gama de estrategias de remediación de metales. La principal ventaja que ofrece es que la remediación de metales es autónoma, no reactiva y no tóxica, específica al metal y sensible a la absorción del metal.

2.2.2.2 Producción de biomasa

Las levaduras desempeñan un papel clave en la biotecnología, con aplicaciones en diversas áreas y siendo un modelo eficiente para el estudio de células eucariotas. En los últimos años, el interés por levaduras con capacidad para la remediación de metales pesados ha crecido significativamente, debido a su potencial en biorremediación y su aplicación en procesos ambientales e industriales (Johnson, 2013).

2.3 Definición de términos básicos

- **Bioacumulación:** Es el mecanismo mediante el cual los organismos absorben y retienen sustancias tóxicas, como metales pesados, en sus tejidos, lo que puede generar efectos adversos a lo largo de la cadena trófica (Baker-Austin *et al*., 2006).
- **Biorremediación:** Es un método basado en el uso de microorganismos para restaurar ambientes contaminados con metales pesados, transformando áreas degradadas en espacios verdes. Este método es más efectivo y ecológico que los métodos físicos y convencionales, ya que convierte los metales en formas no tóxicas (Gadd, 2010).
- **Biosorción:** Es el proceso mediante el cual microorganismos y otras biomoléculas capturan metales pesados en la superficie celular, ayudando a reducir la toxicidad en el ambiente (Volesky, 2007).

- **Biotransformación:** Los microorganismos transforman metales pesados en formas menos tóxicas mediante procesos bioquímicos (Hussein *et al*., 2005).
- **Fitorremediación** Es la biorremediación asistida por microrganismos, los que facilitan al interactuar con las plantas, así como también aumentan el crecimiento y la biomasa de la planta hiperacumuladora en los sitios contaminados (Tirry *et al*. 2018). Los microrganismos facilitan la biodisponibilidad de los metales pesados a las plantas mediante la acidificación, la liberación de sustancias quelantes y el cambio de los potenciales redox (Whiting *et al*. 2001).
- **Metales pesados:** Son iones con orbitales parcialmente o completamente llenos, con un peso atómico que oscila entre 63,5 u y 200,6 u, y una gravedad específica superior a 5. (Ali *et al*., 2019).
- **Microrganismos metalotolerantes:** Han desarrollado mecanismos para resistir la toxicidad de estos elementos, incluyendo barreras extracelulares, expulsión de iones, bioacumulación, transformaciones enzimáticas y unión a proteínas (Romaniuk *et al*., 2018). Además, pueden sobrevivir y detoxificar metales en suelos y sistemas hídricos contaminados, expresando genes de resistencia a estos compuestos (Crupper *et al*., 1999; Borremans *et al*., 2001; Yang *et al*., 2019).
- **Toxicidad**: Es el grado de capacidad que algún contaminante nocivo tiene para producir efectos perjudiciales en un ser vivo al entrar en contacto con él, afectando algún órgano, como el hígado (Jaishankar *et al*., 2014).

2.4 Hipótesis de investigación

2.4.1 Hipótesis general

Los metales pesados (cromo, cobre, mercurio y cadmio) ejercen un efecto negativo sobre una levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa en Oyón, Lima

2.4.2 Hipótesis específicas

- Se describirá el aislamiento y caracterización de levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima.
- Los metales pesados ejercen un efecto negativo sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima.
- La concentración de metales pesados ejerce un efecto negativo sobre la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima.

2.5 Operacionalización de variables

Tabla 1

Matriz de Operacionalización de variables

Variable	Concepto	Operacionalización de variables		
		Dimensión	**Indicadores**	**Método**
Metales pesados	Son sustancias químicas densas que resultan tóxicas para los organismos vivos a altas concentraciones. (Ali et al., 2019).	Tipo	Cromo Cobre Mercurio Cadmio	Razón (Espectrofotometría de absorción atómica)
		Concentración	ppm	Razón (Dilución volumétrica)
Levadura Psicrotolerante	Es un hongo unicelular capaz de crecer y mantenerse activa a bajas temperaturas, especialmente en ambientes fríos naturales. (Segal-Kischinevzky et al., 2022)	Parámetros	Potencial de hidrogeno (pH) Temperatura (C°)	Razón (Potenciómetro y termómetro)
		Morfología	Tinciones	(Coloración Gram y observación microscópica)
		Crecimiento	Biomasa	Razón (Peso seco la estufa)

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Diseño Metodológico

3.1.1 Tipo de investigación

La investigación de tipo básica-aplicada facilita la adquisición de conocimientos y el análisis de fenómenos, permitiendo su aplicación inmediata en contextos específicos para abordar una realidad determinada (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). La prospección de microorganismos metalotolerantes muestra una aplicación en procesos biotecnológicos para la reducción de metales pesados.

3.1.2 Nivel de investigación

Según el objetivo de la investigación, el alcance es descriptivo-explicativo ya que permitió identificar y detallar propiedades, características y aspectos clave del fenómeno en estudio, aportando una comprensión más profunda de su comportamiento (Hernández et al., 2010). Es por ello, que el estudio describe a la levadura psicrotolerante y el efecto de los metales pesados sobre su crecimiento.

3.1.3 Diseño

El diseño pre-experimental se empleó para determinar el efecto de una variable independiente manipulada sobre una variable dependiente, permitiendo establecer relaciones de causa y efecto en el fenómeno estudiado (Hernández *et al.*, 2010). En este estudio, se evaluó su nivel de adaptación a metales pesados de los microorganismos aislados, donde se controló la concentración de cada metal y se midió el crecimiento microbiano en respuesta a estas condiciones.

3.1.4 Enfoque

El enfoque mixto consiste es la integración estructurada de métodos cualitativos y cuantitativos dentro de un mismo estudio, con el objetivo de obtener una mayor interpretación más amplia y detallada del fenómeno investigado (Hernández et al., 2010). La parte cualitativa es la presencia o ausencia de crecimiento microbiano y la parte cuantitativa las diferentes concentraciones de metales pesados en los ensayos experimentales de tolerancia.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

La población de estudio está constituida por el conjunto de microorganismos psicrotolerantes presentes en las aguas contaminadas de la Laguna Shucshapa, ubicada en el distrito de Oyón, provincia de Oyón, región Lima, Perú. Estas aguas están expuestas a condiciones extremas de altitud y temperatura, así como a una alta carga de metales pesados derivados de las operaciones mineras, principalmente provenientes de los relaves del socavón de la Minera Raura (Figura 6), situado en la base del nevado León Dormido.

El proceso de desglaciación, acelerado por el cambio climático, contribuye a la acumulación de agua y al transporte de contaminantes desde zonas altas hacia la laguna. Como resultado, se ha generado un ecosistema acuático impactado, en el cual habitan y se desarrollan comunidades microbianas capaces de adaptarse a ambientes fríos y contaminados, constituyendo así la unidad biológica de análisis de esta investigación.



Figura 6. Zona de llegada a puntos de muestreo en la Laguna Shucshapa.

3.2.2 Muestra

La muestra fue de tipo no probabilística por conveniencia, determinada en función de la accesibilidad geográfica, condiciones climáticas y la presencia esperada de microorganismos psicrotolerantes en sectores estratégicos de la Laguna Shucshapa. La selección se realizó con el objetivo de capturar diversidad microbiológica representativa del ecosistema acuático impactado por metales pesados.

Se recolectaron un total de cinco muestras de agua superficial, a una profundidad aproximada de 15 centímetros, distribuidas de la siguiente manera: cuatro muestras en las orillas (noreste, noroeste, sureste y suroeste) y una muestra en el centro de la laguna, con el fin de cubrir las posibles variaciones espaciales en la concentración de contaminantes y la presencia de microorganismos adaptados.

Cada muestra fue recolectada en frascos estériles de polietileno de 100 mL, rotulados y almacenados inmediatamente en una caja térmica con refrigeración portátil (4 °C aprox.), a fin de preservar la integridad biológica y fisicoquímica de las muestras hasta su procesamiento en el laboratorio.

Para asegurar la exactitud en la localización de los puntos de muestreo, se utilizó un GPS Garmin Rino 110, registrando la altitud y coordenadas exactas de cada muestra. Además, en cada sitio se midieron parámetros meteorológicos: humedad relativa, temperatura ambiental y velocidad del viento. Finalmente, se evaluaron los parámetros físico-químicos del agua, incluyendo temperatura, pH, concentración de cloruros y niveles de CO_2, mediante el uso de un Fresh Water Aquaculture Kit.

3.3 Técnicas de recolección de datos

3.3.1 Protocolo de muestreo

Para garantizar la trazabilidad y fiabilidad de las muestras recolectadas en la Laguna Shucshapa, se aplicaron protocolos de muestreo estandarizados, en concordancia con los lineamientos de la *Guía Nacional de Muestreo de Aguas Superficiales* (MINAM, 2011) y la *Norma Técnica Peruana NTP ISO 5667-3:2019* sobre conservación y manipulación de muestras acuáticas.

Las condiciones y procedimientos establecidos fueron los siguientes:

- Tipo de muestra: Agua superficial contaminada con presencia potencial de microorganismos psicrotolerantes.
- Profundidad: 15 cm desde la superficie, para adquirir una muestra representativa del cuerpo de agua sin alterar la capa de sedimentos.
- Material de muestreo: Frascos de polietileno estériles de 100 mL, rotulados individualmente y con tapa hermética, asegurando condiciones asépticas.

- Técnica de muestreo: Inmersión directa de los frascos, evitando el contacto con sedimentos, bordes de la laguna o cualquier superficie que pueda comprometer la esterilidad.
- Puntos de muestreo: Cinco en total; cuatro distribuidos en las orillas (noreste, noroeste, sureste y suroeste) y uno en el centro de la laguna, con el propósito de cubrir variaciones espaciales en la concentración de metales pesados y la diversidad microbiológica.
- Medición in situ: Se registraron parámetros fisicoquímicos del agua como pH, temperatura, concentración de cloruros y niveles de dióxido de carbono (CO_2), mediante el uso de un kit portátil *Fresh Water Aquaculture Kit*.
- Registro de datos: Cada muestra fue codificada y documentada con fecha, hora, coordenadas UTM, altitud y condiciones climáticas (humedad relativa, temperatura ambiental y velocidad del viento), empleando un GPS Garmin Rino 110 (tabla 2) para la georreferenciación.

Tabla 2

Ubicación georreferenciada de los puntos de muestreo en la Laguna Shucshapa

Punto	X UTM (m)	Y UTM (m)	Huso	Altitud (msnm)	Descripción
Centro	308613,7	8838419	18	4283,8	Centro de la laguna
Borde noreste	308615,8	8838426	18	4283,8	Borde noreste
Borde noroeste	308611,4	8838425	18	4283,8	Borde noroeste
Borde suroeste	308612,9	8838411	18	4283,8	Borde suroeste
Borde sureste	308617,2	8838413	18	4283,8	Borde sureste

- Preservación y transporte: Las muestras se mantuvieron en cadena de frío, dentro de una caja térmica a 4 °C ± 2, y fueron trasladadas el mismo día al laboratorio, asegurando un tiempo máximo de 6 horas entre la recolección y el inicio del procesamiento, en cumplimiento de la norma NTP ISO 5667-3:2019.

3.3.2 Preparación del medio de cultivo

Se prepararon 600 mL de caldo YPG (Yeast extract, Peptone y Glucose) contiene (glucosa 3 g, peptona de carne 1 g y extracto de levadura 0.5 g por cada 100 mL de agua destilada) con un pH ajustado a 7 (Figura 4). La solución se distribuyó en seis matraces de 100 mL y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos a 15 lb/pulg^2 de presión, luego se acondicionó a 5°C por 24 horas para garantizar su esterilidad. Para el medio sólido, se

prepararon 400 mL de agar YPG ajustado a pH 7, sometiéndolos a autoclavado bajo las mismas condiciones. Una vez enfriado a 50°C, se distribuyeron 25 mL en cada placa de Petri, manteniéndolas a 5°C por 24 horas antes de su uso para asegurar su estabilidad y esterilidad (ver Figura 7).



Figura 7. Preparación de medio de cultivo YPG medio líquido y sólido.

3.3.3 Aislamiento microbiológico

Se añadieron 10 mL de las muestras colectadas a 90 mL de caldo YPG, asegurando una proporción adecuada para la propagación de microorganismos. La mezcla se incubó en condiciones estáticas a 5°C durante 20 días, favoreciendo el crecimiento de levaduras psicrotolerante (Figura 8). Posteriormente, se realizó la siembra en agar YPG mediante el método de depleción por estrías, con el objetivo de obtener cepas puras para su posterior caracterización.



Figura 8. Aislamiento e incubación de levadura a 5°C en estático.

3.3.3 Caracterización morfológica, bioquímica y molecular

Se observó el crecimiento de colonias aisladas en agar YPG, las cuales fueron caracterizadas mediante la evaluación de forma, color y borde de las colonias. Para la caracterización microscópica, se realizaron tinciones con azul de metileno y tinción de Gram (Figura 6), permitiendo la observación de la morfología celular.

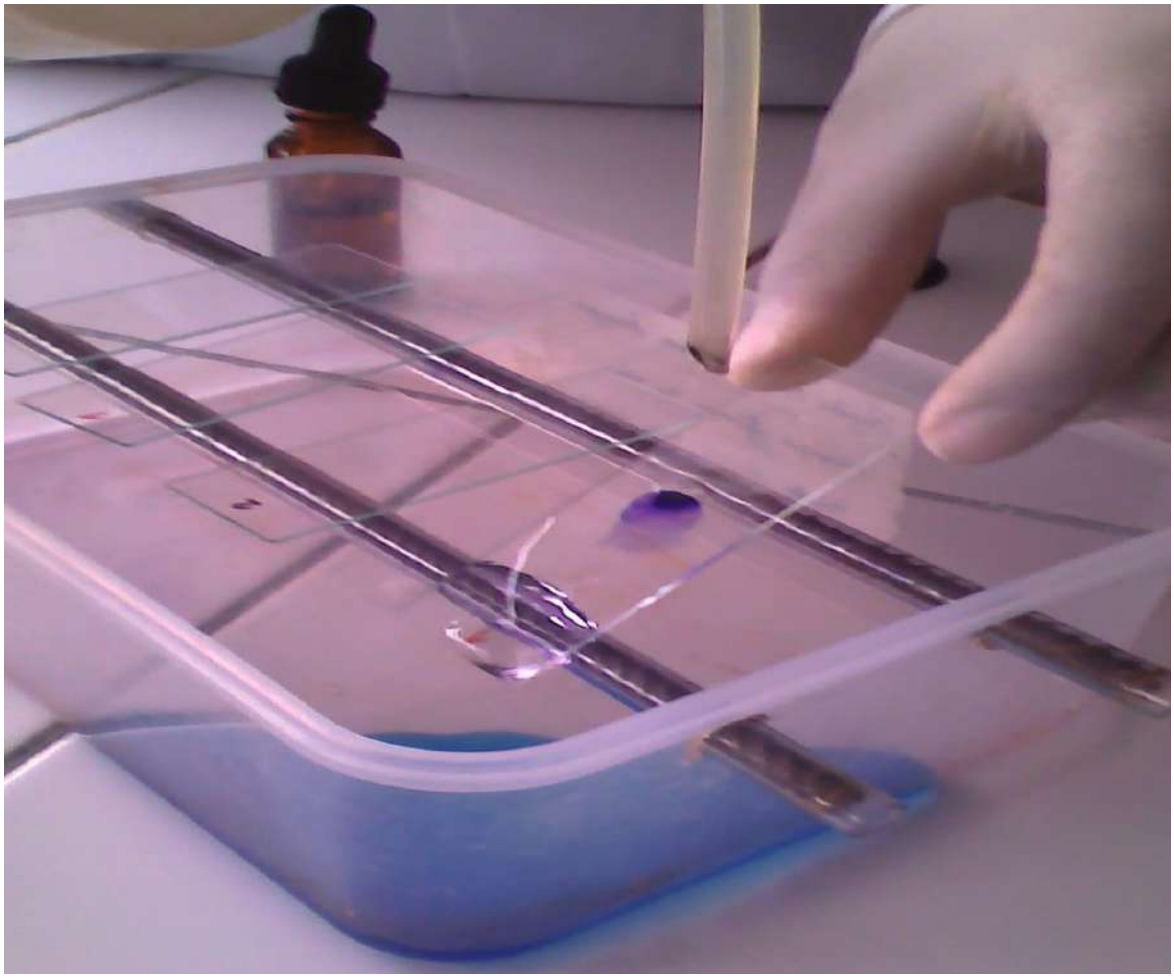


Figura 9. Realización de tinción con azul de metileno y Gram.

La caracterización bioquímica se llevó a cabo mediante diferentes ensayos en medios selectivos (Figura 10). Se utilizó agar urea para evaluar la actividad ureásica, Sierra Medium (composición en g/100 mL: agarosa 0,1, peptona 0,1, NaCl 0,5, $CaCl_2$ 0,01 y Tween 80 al 1%) para determinar la actividad lipolítica, starch agar (agar nutritivo 3,1 g/100 mL y almidón 1,0 g/100 mL) para detectar la actividad amilásica, y cellulose medium para evaluar la actividad celulolítica en las cepas puras obtenidas.

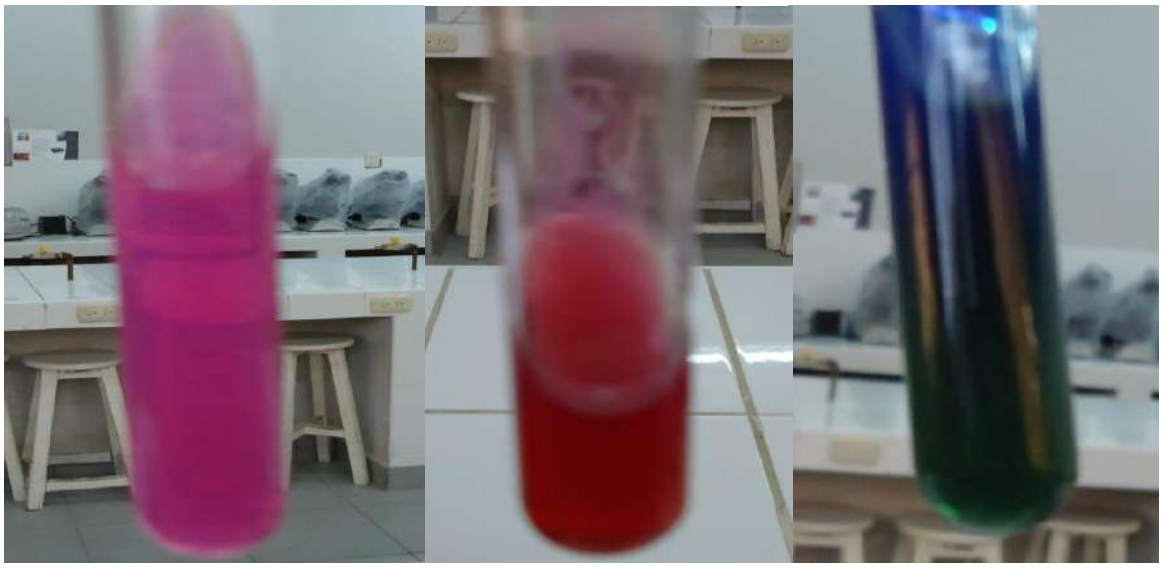


Figura 10. Preparación de medios de cultivo para pruebas bioquímicas.

La identificación molecular de la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa, Oyón, Lima, se realizó con el apoyo del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), bajo la supervisión del Blgo. Mg. Tito Libio Sánchez Rojas. Se llevó a cabo la extracción del ADN genómico a partir de cultivos en medio líquido YPG, empleando un protocolo de lisis celular y purificación con un kit comercial.

El ADN extraído se empleó como molde para la amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) de la región 18S rRNA, empleando cebadores universales específicos para levaduras. La verificación de los productos amplificados se efectuó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, y las bandas obtenidas fueron enviadas a un servicio especializado para secuenciación. Posteriormente, las secuencias recibidas fueron analizadas mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), permitiendo la identificación de la especie aislada a partir del contraste con secuencias depositadas en bases de datos internacionales.

3.3.4 Conservación y activación

Una vez obtenidas las cepas puras, estas fueron conservadas en caldo YPG con glicerol en microtubos de 2 mL y almacenadas a -20°C para su preservación a largo plazo.

Para la reactivación de las cepas crioconservadas, se prepararon 50 mL de caldo YPG ajustado a pH 7, los cuales fueron distribuidos en cinco tubos de 10 mL. Posteriormente, los

medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C, 15 lb de presión durante 15 minutos. Luego del proceso de autoclavado, los tubos se enfriaron a temperatura ambiente antes de proceder con la inoculación. Para la activación, se retiró 1 mL de la cepa pura crioconservada y se inoculó en los medios estériles. Finalmente, las cepas fueron incubadas a 10°C por 5 días, permitiendo su recuperación y posterior crecimiento bajo condiciones controladas.

3.3.5 Optimización de crecimiento

Temperatura (°C)

Se prepararon tres placas de Petri con agar YPG ajustado a pH 7, asegurando condiciones homogéneas para el crecimiento de la levadura. Posteriormente, se realizó la siembra por agotamiento de la cepa pura de *Apiotrichum dulcitum*, distribuyéndola de manera decreciente sobre la superficie del medio. Las placas inoculadas fueron incubadas en condiciones controladas a 5°C, 25°C y 37°C por 10 días. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se registró la presencia y densidad de las colonias formadas en cada temperatura.

Potencial de hidrogeno (pH)

Para analizar el crecimiento de A. dulcitum en distintos valores de pH, se prepararon medios líquidos caldo YPG ajustados a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, empleando soluciones de HCl 1M o NaOH 1M para su regulación. Luego, cada medio fue esterilizado en autoclave a 121°C y 15 lb de presión por 15 minutos. Tras enfriarse a temperatura ambiente, se inocularon con la cepa en condiciones asépticas y se incubaron a 25°C en condiciones estáticas por 10 días. Para asegurar la fiabilidad de los resultados, el experimento se realizó por triplicado. La evaluación del crecimiento se determinó mediante medición de absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro UV/Vis, registrando la densidad celular en cada condición de pH.

3.3.6 Ensayo de tolerancia a metales pesados

Se prepararon soluciones con concentraciones específicas de metales pesados en matraces Erlenmeyer conteniendo caldo YPG, ajustadas a 100, 250 y 500 ppm de Cr^{6+}; 50, 100 y 200 ppm de Cd^{2+}; 30, 50 y 100 ppm de Hg^{2+}; y 50, 100 y 200 ppm de Cu^{2+}. Estas concentraciones fueron obtenidas a partir de soluciones stock previamente cuantificadas mediante espectrometría de absorción atómica, con valores iniciales de 8200 ppm para Cr^{6+}, 10400 ppm para Cd^{2+}, 10000 ppm para Hg^{2+} y 9600 ppm para Cu^{2+}. Posteriormente, se inocularon

100 µL de la cepa de *Apiotrichum dulcitum* en cada una de las condiciones preparadas en medio líquido (Tabla 3). Los cultivos fueron incubados a 25°C durante 10 horas para evaluar la tolerancia y crecimiento de la levadura en presencia de los metales pesados.

Tabla 3

Concentraciones de metales pesados evaluadas sobre A. dulcitum, indicando las soluciones stock, los niveles de exposición y la concentración aproximada del inóculo.

Metal pesado	Sal utilizada (fuente)	Concentración stock (ppm)	Concentraciones evaluadas (ppm)	Microorganismo expuesto	Concentración del inóculo
Cromo (Cr^{6+})	$K_2Cr_2O_7$	8200	100, 250, 500	*Apiotrichum dulcitum*	OD620 ≈ 0.8
Cadmio (Cd^{2+})	$CdCl_2 \cdot H_2O$	10400	50, 100, 200	*Apiotrichum dulcitum*	OD620 ≈ 0.8
Mercurio (Hg^{2+})	$HgCl_2$	10000	30, 50, 100	*Apiotrichum dulcitum*	OD620 ≈ 0.8
Cobre (Cu^{2+})	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	9600	50, 100, 200	*Apiotrichum dulcitum*	OD620 ≈ 0.8

3.3.7 Ensayo de crecimiento en medio líquido

Para el cultivo del inóculo de la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima, se preparó un volumen de 50 ml de caldo YPG en condiciones estériles, el cual fue inoculado con la levadura e incubado a 25°C durante 10 días para permitir su adaptación y crecimiento óptimo. Posteriormente, se tomó un 1% del inóculo y se transfirió a matraces Erlenmeyer de 500 ml, cada uno conteniendo 250 ml de caldo YPG suplementado con mercurio en dos concentraciones experimentales: 50 ppm y 100 ppm. El experimento se realizó por triplicado para asegurar la reproducibilidad y fiabilidad de los datos.

Para evaluar la interacción entre la levadura y el mercurio, se cuantificó la concentración inicial de mercurio en cada tratamiento mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA). Tras el período de incubación, se realizó una segunda cuantificación de la concentración final de mercurio para determinar la capacidad de la levadura en la absorción o transformación del metal.

3.4 Técnicas para el procesamiento de la información

Para el análisis de datos, se utilizó el software estadístico IBM SPSS Statistics 25.00, mediante el cual se aplicaron pruebas de estadística descriptiva, incluyendo promedio, desviación estándar (σ), mediana, varianza y coeficiente de variación, con el fin de evaluar la dispersión y tendencia central de los datos obtenidos. Asimismo, se generaron gráficos representativos para visualizar la distribución de los resultados. Para la comparación de los

efectos experimentales, se empleó la prueba t-Student para muestras relacionadas, considerando un nivel de confianza del 95%, permitiendo determinar diferencias significativas en las variables analizadas.

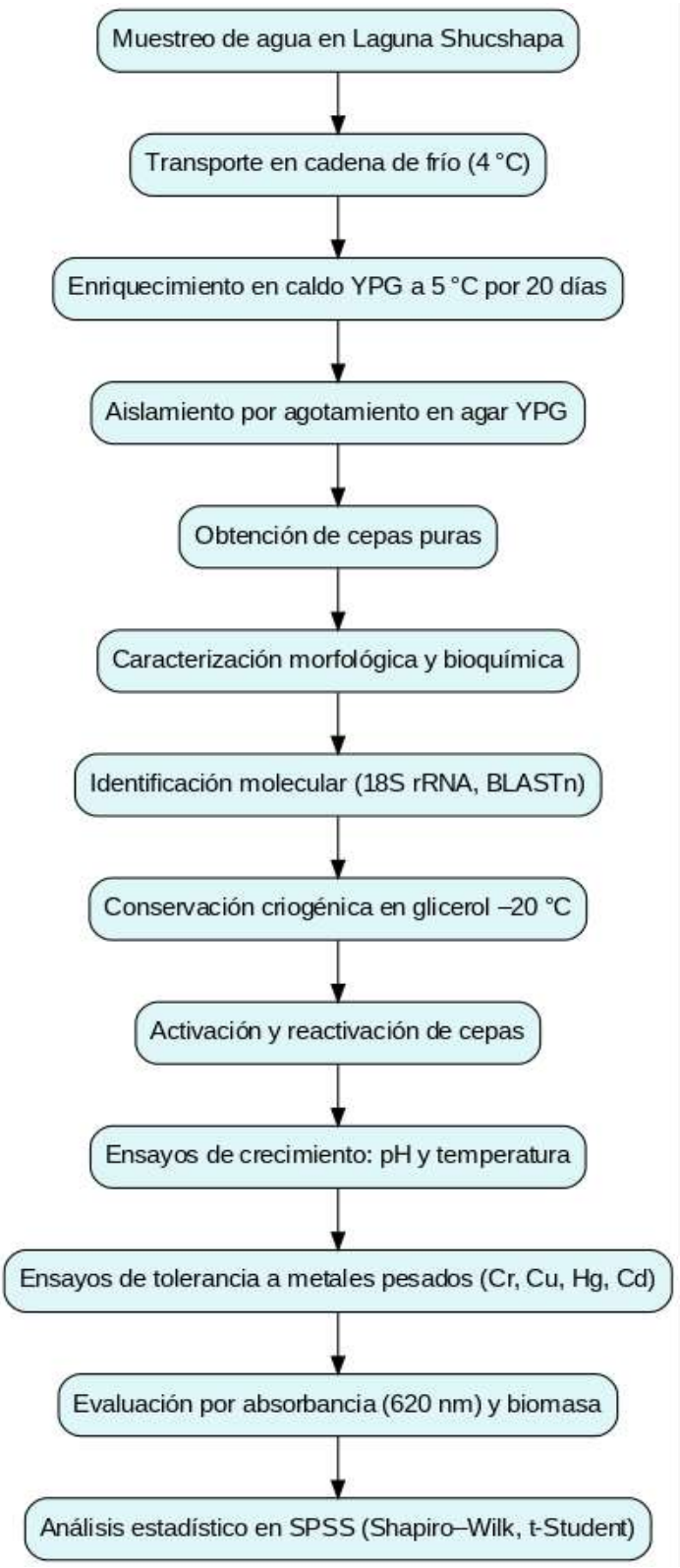


Figura 11. Flujograma metodológico que describe las etapas clave de la investigación.

Nota: Desde el muestreo en campo hasta el análisis estadístico, para evaluar el comportamiento de *Apiotrichum dulcitum* frente a metales pesados.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Análisis de resultados

En los resultados del estudio se logró identificar el efecto de los metales pesados (cromo, cobre, mercurio y cadmio) sobre la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima. Asimismo, se comprobó la hipótesis general del estudio, concluyéndose que la existencia de estos metales pesados influye significativamente en el crecimiento y desarrollo de la levadura psicrotolerante, lo que sugiere su potencial aplicación en procesos de biorremediación en ambientes contaminados.

4.1.1 Muestreo microbiológico

Durante el muestreo realizado en la Laguna Shucshapa, ubicada en el distrito y provincia de Oyón, departamento de Lima, se registraron las condiciones meteorológicas, geográficas y fisicoquímicas del agua, con el fin de caracterizar el entorno ambiental que podría favorecer la presencia de microorganismos psicrotolerantes con capacidad para la biorremediación de metales pesados.

En cuanto a las condiciones meteorológicas, la laguna se encuentra en una zona altoandina, a una altitud de 4283,8 m s. n. m., correspondiente a la región ecológica Jalca o Suni. El clima en la zona es frío y seco, con alta variabilidad atmosférica. Durante el muestreo, la humedad relativa registrada fue de 34,1 %, lo que indica un ambiente seco con baja saturación de vapor de agua. La velocidad del viento alcanzó 1,6 m/s, sugiriendo una circulación de aire moderada que puede influir en la dinámica del ecosistema acuático.

Para garantizar la exactitud en la ubicación de los puntos de recolección de muestras microbiológicas, se utilizó el sistema de coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator), Zona 18 Sur, con el Datum WGS 84, ampliamente aceptado en estudios geoespaciales. Las coordenadas geográficas obtenidas mediante GPS de mano fueron transformadas a UTM, permitiendo una georreferenciación exacta. En forma referencial, los puntos de muestreo se encontraron en un rango comprendido entre los 322430 m Este – 323010 m Este y 8781950 m Norte – 8782430 m Norte, abarcando tanto la zona central como las orillas este y oeste de la laguna (ver Tabla 4).

Tabla 4

Concentración de parámetros fisicoquímicos de la toma de muestra

PUNTOS DE MUESTREO	X (m)	Y (m)	HUSO	ALTITUD (m s. n. m.)	PROFUNDIDAD (cm)	DESCRIPCIÓN	PARAMETROS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA	
1	308613,7	8838419	18	4283,8	15	Centro de la laguna	T°	6 a 6.5 °C
2	308615,8	8838426	18	4283,8	15	Borde noreste	pH	6.8 a 7.2
3	308611,4	8838425	18	4283,8	15	Borde noroeste	[ ]CO2	7 ppm
4	308612,9	8838411	18	4283,8	15	Borde suroeste	[ ] Cl^-	12 ppm
5	308617,2	8838413	18	4283,8	15	Borde sureste		

En cuanto a las condiciones físico-químicas del agua, la temperatura de la muestra osciló entre 6°C y 6.5°C, lo que evidencia la influencia de las bajas temperaturas ambientales propias de ecosistemas altoandinos. El pH se encontró dentro de un rango de 6.8 a 7.2, lo que indica una ligera tendencia a la neutralidad, favoreciendo la estabilidad de los procesos bioquímicos y microbiológicos en el medio acuático. Los niveles de dióxido de carbono (CO_2) disuelto en el agua fueron de 7 ppm, sugiriendo una moderada actividad biológica y procesos de intercambio gaseoso en la superficie de la laguna. La concentración de cloruros (Cl^-) alcanzó los 12 ppm, lo que puede estar asociado a procesos naturales de disolución de minerales en el ecosistema acuático.

4.1.2 Aislamiento microbiológico

Se logró aislar únicamente una levadura logró ser aislada con éxito. Este resultado puede atribuirse a diversos factores ambientales y fisiológicos que influyen en la viabilidad y proliferación de los microorganismos. La incubación a 5°C durante 20 días en caldo YPG pudo haber generado un ambiente selectivo donde solo microorganismos con capacidad psicrotolerante lograron sobrevivir. Además, el estrés por nutrientes, la competencia microbiana y la adaptación a condiciones específicas del medio pueden haber limitado el crecimiento de otras especies. Finalmente, la siembra en agar YPG por agotamiento en estrías permitió la obtención de una cepa pura, destacando la importancia de las condiciones de cultivo en la recuperación de microorganismos con potencial biotecnológico.

4.1.3 Caracterización morfológica y bioquímica

Como parte del análisis microbiológico, se llevó a cabo la caracterización morfológica, bioquímica y enzimática de la levadura aislada LS-L1 (Figura 9). La evaluación macroscópica de las colonias en medios de cultivo específicos mostró una morfología en aro, con coloración blanca y un borde entero, características típicas de ciertas levaduras adaptadas a ambientes acuáticos extremos.

El análisis microscópico mediante tinción con azul de metileno y tinción de Gram confirmó que la levadura LS-L1 es Gram positiva, lo que sugiere una estructura celular robusta, caracterizada por una pared celular rica en quitina y glucanos. Estas propiedades son comunes en levaduras con potencial biotecnológico, ya que confieren resistencia estructural, protección frente a condiciones adversas y estabilidad fisiológica, favoreciendo su aplicación en diversos procesos industriales y ambientales.

Desde el punto de vista bioquímico, la levadura fue sometida a la prueba de agar urea, obteniendo un resultado negativo, lo que sugiere la ausencia de actividad ureásica, un rasgo importante en la identificación diferencial de especies de levaduras.

Respecto a la caracterización enzimática, la cepa LS-L1 evidenció actividad lipolítica positiva, demostrada por crecimiento y la formación de halos de hidrólisis en medio con lípidos, lo que indica la producción de lipasas, enzimas involucradas en la degradación de grasas y compuestos hidrofóbicos. En cuanto a la actividad amilolítica, la levadura mostró crecimiento y halos positivos en la prueba de amilasa, lo que confirma su capacidad para hidrolizar almidones y potencialmente metabolizar compuestos carbohidratados complejos.

Sin embargo, en la prueba de actividad celulásica, la cepa no mostró crecimiento ni formación de halos en el medio con celulosa, indicando ausencia de actividad celulasa y, por lo tanto, una incapacidad para degradar polisacáridos estructurales como la celulosa.

En la identificación molecular, el análisis BLASTn mostró una identidad del 99.66% con *Apiotrichum dulcitum* (accesión KY106116.1), con una cobertura de consulta del 94%, un E-value de 0.0 y un puntaje total de 1064 (Figura 13). El alineamiento de secuencias reveló una coincidencia de 578 de 580 pares de bases (99%), sin presencia de gaps (0%), lo que confirma una correspondencia altamente significativa con *A. dulcitum*.

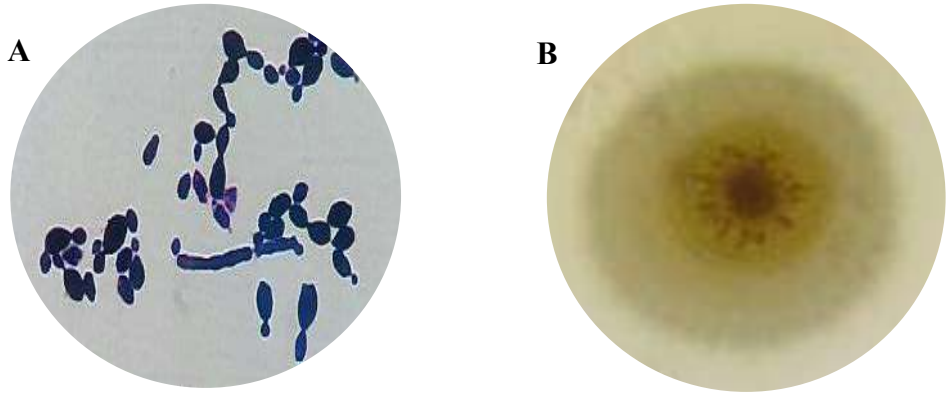


Figura 12. Observación de la levadura LS-L1.

Nota: A. Imagen de microscopía óptica (40X) con azul de metileno, donde se observan células ovaladas en gemación, característica de levaduras en fase reproductiva. B. Colonias en agar YPG con crecimiento homogéneo y leve pigmentación central, indicando su adaptación al medio de cultivo.

Apiotrichum dulcitum culture CBS:8257 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: KY106116.1 Length: 928 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 580 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1064 bits(576)	0.0	578/580(99%)	0/580(0%)	Plus/Minus

```
Query  40   GTGGGCGANNCCCGGCCATAAAGGCGAGCTGCAGTCCTCAGTCTCCTCCAGTGTATGCAA  99
            ||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  580  GTGGGCGAACCCCGGCCATAAAGGCGAGCTGCAGTCCTCAGTCTCCTCCAGTGTATGCAA  521

Query  100  TACTAGGCTATAACACTTCCGAAGAAGCCACATTCCTAATACCTTTATCCACCGAACAAA  159
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  520  TACTAGGCTATAACACTTCCGAAGAAGCCACATTCCTAATACCTTTATCCACCGAACAAA  461

Query  160  ACTGATGTTGACCCGTTTAAAGGAAGTACACCGAAGACCGGCTGAATCCAATAAACACGA  219
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  460  ACTGATGTTGACCCGTTTAAAGGAAGTACACCGAAGACCGGCTGAATCCAATAAACACGA  401

Query  220  CTGACTTCAATCGTTTCCCTTTTAACAATTTCACGTACTGTTTAACTCTCTTTCCAAAGT  279
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  400  CTGACTTCAATCGTTTCCCTTTTAACAATTTCACGTACTGTTTAACTCTCTTTCCAAAGT  341

Query  280  GCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTT  339
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  340  GCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTT  281

Query  340  TAGATGGAATTTACCACCCATTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTAGAGAAC  399
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  280  TAGATGGAATTTACCACCCATTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTAGAGAAC  221

Query  400  GTATCACAGAGCACTGATGATTGTGTAAAGTACGGGATTGTCACCCTCTTTGATACCCTG  459
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  220  GTATCACAGAGCACTGATGATTGTGTAAAGTACGGGATTGTCACCCTCTTTGATACCCTG  161

Query  460  TTCCAAGGGACTTATACACAGTTCAGCACGGAAAACGCTTCTATAGATTACAACTCGGAC  519
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  160  TTCCAAGGGACTTATACACAGTTCAGCACGGAAAACGCTTCTATAGATTACAACTCGGAC  101

Query  520  TATCGAAGACAGCCAGATTACAAATTTGAGCTCTTCCCGGTTCACTCGCCGTTACTAAGG  579
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  100  TATCGAAGACAGCCAGATTACAAATTTGAGCTCTTCCCGGTTCACTCGCCGTTACTAAGG  41

Query  580  GAATCCTTGTTAGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC  619
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  40   GAATCCTTGTTAGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC  1
```

Figura 13. Resultado del alineamiento de la secuencia del ARN ribosomal de la subunidad grande (LSU rRNA).

Nota: Levadura aislada con *Apiotrichum dulcitum* (accesión KY106116.1) en la base de datos GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

4.1.4 Optimización de crecimiento (efecto en la levadura)

Cinética de crecimiento

Se evaluó la cinética de aumento de *Apiotrichum dulcitum* a 25°C, midiendo la absorbancia y la biomasa seca (g/L) durante un período de 10 días para determinar las fases de crecimiento y la duración de la fase logarítmica (Figura 14).

Durante las primeras 24 horas, se registró una fase de adaptación (fase de latencia), con una absorbancia de 0,215 y una biomasa de 1,2 g/L, lo que indica un metabolismo inicial sin una proliferación celular significativa. A partir del segundo día, comenzó la fase exponencial (logarítmica), caracterizada por un incremento progresivo en la densidad celular, alcanzando una absorbancia de 1,032 y una biomasa de 4,5 g/L al día 5.

El crecimiento continuó hasta el día 10, donde se observó el máximo crecimiento celular con una absorbancia de 1,587 y una biomasa seca de 6,8 g/L, indicando el final de la fase logarítmica. Posteriormente, se espera una transición al periodo estacionario, donde la proliferación celular se regula con la tasa de muerte debido a la barrera de nutrientes y acumulación de metabolitos (ver tabla 5).

Tabla 5

Aislamiento microbiológico para la evaluación de la cinética de crecimiento

Cinética de crecimiento	Absorbancia	Biomasa g/L
Fase de latencia / día 1	0,215	1,2
Fase exponencial (logarítmica) día 5	1,032	4,5
Fase logarítmica/día 10	1,587	6,8

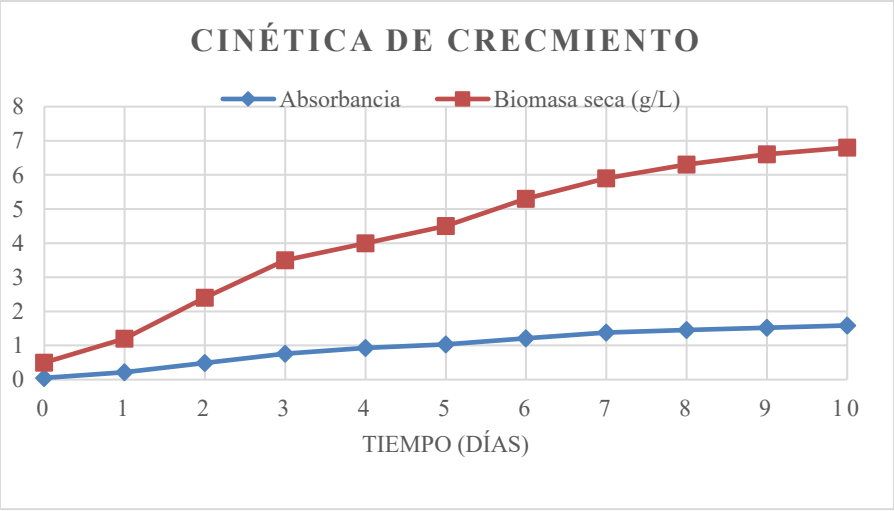


Figura 14. Cinética de Crecimiento de Apiotrichum dulcitum a 25° por 10 días.

Crecimiento a diferentes temperaturas (°T)

Se evaluó el crecimiento de Apiotrichum dulcitum en Agar YPG a pH 7, mediante incubación a 5°C, 25°C y 37°C durante 10 días, determinando la absorbancia como indicador de densidad celular y estimando la biomasa seca correspondiente (ver Tabla 6). Los resultados mostraron que, a 5°C, el crecimiento fue mínimo, con una absorbancia de 0,215 y una biomasa seca de 1,2 g/L, lo que indica una baja tasa metabólica a temperaturas frías. A 25°C, se registró el máximo crecimiento, con una absorbancia de 1,412 y una biomasa seca estimada de 6,0 g/L, confirmando que esta es la temperatura adecuada para el desarrollo

de A. dulcitum en las condiciones evaluadas. En contraste, a 37°C, el crecimiento disminuyó, con una absorbancia de 0,764 y una biomasa de 3,5 g/L, lo que sugiere que temperaturas elevadas afectan negativamente la proliferación de la levadura.

Tabla 6

Crecimiento a diferentes temperaturas (°t) / 10 días

°C	Absorbancia	Biomasa g/L
5	0.215	1,2
25	1,412	6,0
37	0,764	3,5

Crecimiento a diferentes pH

Se evaluó el crecimiento de la levadura *Apiotrichum dulcitum* en diferentes valores de pH, midiendo la absorbancia como indicador de densidad celular y estimando la biomasa seca después de 10 días de incubación a 25°C.

Los resultados mostraron que en condiciones ácidas (pH 3-4) el crecimiento fue reducido, con absorbancias de 0,364 y 0,468, lo que equivale a una biomasa seca de aproximadamente 1,5 g/L y 2,0 g/L, respectivamente (ver Tabla 7**)**. A partir de pH 5, se observó un incremento progresivo en la densidad celular, alcanzando el máximo crecimiento a pH 9, con una absorbancia de 1,315 y una biomasa seca estimada de 5,5 g/L, indicando que este es el rango óptimo de desarrollo para A. dulcitum en las condiciones evaluadas.

Tabla 7

Crecimiento a diferentes pH

pH	Absorbancia	Biomasa g/L
3- 4	0,364 y 0,468	1,5 y 2,0
5- 9	1,315	5,5
10	1,037	4,3
11	0,858	3,6

En valores de pH alcalinos superiores a 9, el crecimiento comenzó a disminuir, con absorbancias de 1,037 en pH 10 y 0,858 en pH 11, con biomasa de 4,3 g/L y 3,6 g/L, respectivamente. Finalmente, en pH 12 y 13, la biomasa se redujo considerablemente (3,2 g/L y 2,5 g/L), evidenciando una menor adaptación a condiciones extremadamente alcalinas.

4.1.5 Ensayo de tolerancia a metales pesados (efecto en la levadura)

Se evaluó la adaptación de *Apiotrichum dulcitum* frente a distintas concentraciones de los metales Cr^{6+}, Cu^{2+}, Hg^{2+} y Cd^{2+}, utilizando el crecimiento celular como indicador biológico de resistencia. Los patrones de crecimiento observados revelaron respuestas diferenciales de tolerancia, lo que sugiere la presencia de mecanismos específicos de adaptación respecto a cada metal pesado (ver Tabla 8).

Tabla 8

Ensayo de tolerancia a metales pesados

Metal pesado	Sal utilizada (fuente)	Concentración stock (ppm)	Concentraciones evaluadas (ppm)	Microorganismo expuesto	Concentración del inóculo
Cromo (Cr^{6+})	$K_2Cr_2O_7$	8200	100, 250, 500	*Apiotrichum dulcitum*	OD620 ≈ 0.8
Cadmio (Cd^{2+})	$CdCl_2 \cdot H_2O$	10400	50, 100, 200	*Apiotrichum dulcitum*	OD620 ≈ 0.8
Mercurio (Hg^{2+})	$HgCl_2$	10000	30, 50, 100	*Apiotrichum dulcitum*	OD620 ≈ 0.8
Cobre (Cu^{2+})	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	9600	50, 100, 200	*Apiotrichum dulcitum*	OD620 ≈ 0.8

Tolerancia a Cromo (Cr^{6+})

La levadura no mostró crecimiento en ninguna de las proporciones evaluadas (100, 250 y 500 ppm), evidenciando una inhibición total del desarrollo celular en presencia de Cr^{6+}. Este comportamiento indica que *A. dulcitum* carece de mecanismos efectivos para contrarrestar la toxicidad del cromo, cuya acción está asociada a la generación de estrés oxidativo severo, alteración de estructuras celulares y bloqueo de enzimas esenciales, impidiendo cualquier proceso proliferativo.

Tolerancia a Cobre (Cu^{2+})

Se registró crecimiento regular (+) a 50 y 100 ppm, mientras que a 200 ppm no se observó desarrollo. Esto demuestra que *A. dulcitum* tolera moderadamente el Cu^{2+} en niveles bajos a intermedios, probablemente debido a que el cobre actúa como cofactor metabólico en múltiples enzimas mitocondriales y antioxidantes. No obstante, en concentraciones elevadas, el Cu^{2+} puede inducir desestabilización de membranas, daño oxidativo y pérdida de homeostasis celular, lo que explica la ausencia de crecimiento a 200 ppm.

Tolerancia a Mercurio (Hg^{2+})

El crecimiento fue bueno (++) en 30 y 50 ppm, mientras que a 100 ppm fue regular (+). Esta respuesta sugiere una capacidad relevante de tolerancia inicial al Hg^{2+}, aunque limitada a rangos subinhibitorios. La toxicidad progresiva del mercurio se debe a su elevada afinidad por grupos sulfhidrilo de proteínas, que provoca desnaturalización enzimática, alteraciones del metabolismo energético y bloqueo de vías antioxidantes, reduciendo la proliferación a medida que aumenta la concentración.

Tolerancia a Cadmio (Cd^{2+})

Se observó crecimiento regular (+) a 50 y 100 ppm, mientras que a 200 ppm se registró inhibición total (-). Este patrón revela tolerancia moderada frente al Cd^{2+}, posiblemente mediada por mecanismos de exclusión celular, secuestro intracelular mediante proteínas ricas en cisteína o procesos de bioacumulación controlada. Sin embargo, concentraciones elevadas sobrepasan la capacidad detoxificadora de la levadura, generando daño estructural, inhibición proteica y afectación al metabolismo respiratorio, lo que impide el crecimiento a 200 ppm (ver Tabla 9).

Tabla 9

Ensayo de metales pesados

Cromo (Cr^{6+})		**Cadmio (Cd^{2+})**		**Mercurio (Hg^{2+})**		**Cobre (Cu^{2+})**	
[ ] ppm	**Crecimiento**	**[ ] ppm**	**Crecimiento**	**[ ] ppm**	**Crecimiento**	**[ ] ppm**	**Crecimiento**
100	no	50	regular	30	bueno	50	regular
250	no	100	regular	50	bueno	100	regular
500	no	200	inhibición total	100	regular	200	no se observo

4.2 Contrastación de hipótesis

Tabla 10

Contrastación de hipótesis de la investigación

Hipótesis	Contrastación de hipótesis	Fundamento
Los metales pesados (cromo, cobre, mercurio y cadmio) ejercen un efecto negativo sobre una levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa en Oyón, Lima	Se acepta la hipótesis general.	Los ensayos experimentales evidenciaron que la presencia de metales pesados genera alteraciones en el crecimiento y comportamiento fisiológico de la levadura *Apiotrichum dulcitum*. Se observó inhibición total frente al cromo, crecimiento limitado ante cobre y mercurio, y una reducción significativa de cadmio tras la incubación, lo que confirma un efecto negativo global de estos metales sobre la levadura.
Se describirá el aislamiento y caracterización de levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima.	Se acepta la hipótesis específica.	El estudio logró aislar y caracterizar exitosamente una levadura psicrotolerante a partir de muestras de la Laguna Shucshapa, mediante análisis morfológicos, bioquímicos y moleculares. La identificación genética confirmó que la cepa corresponde a *Apiotrichum dulcitum*, cumpliendo con el objetivo planteado en esta hipótesis.
Los metales pesados ejercen un efecto negativo sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima.	Se acepta la hipótesis específica.	Los resultados del ensayo de tolerancia demostraron que el crecimiento de la levadura se ve afectado por la exposición a metales pesados, evidenciándose disminución de la biomasa, reducción de la densidad celular y, en algunos casos, inhibición completa del desarrollo, lo que confirma el impacto negativo sobre su crecimiento.
La concentración de metales pesados ejerce un efecto negativo sobre la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima.	Se acepta parcialmente la hipótesis específica.	El análisis estadístico mostró que la concentración de cadmio presentó una reducción significativa después del tratamiento con la levadura, mientras que para el mercurio no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones iniciales y finales. Esto indica que el efecto de la concentración depende del tipo de metal evaluado.

4.2.1 Efecto del mercurio

Con el objetivo de determinar estadísticamente el efecto del mercurio (50 ppm) sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante *Apiotrichum dulcitum*, en este apartado se desarrolla la contrastación inferencial correspondiente. A diferencia del análisis inicial, que describía únicamente el comportamiento cualitativo del crecimiento, se incorpora ahora el análisis estadístico formal que permite validar con rigor científico la hipótesis planteada por el investigador.

a. Hipótesis del investigador

El mercurio (50 ppm) influye sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante

b. Redacción de la hipótesis

- **H_0:** El mercurio (50 ppm) presenta un impacto negativo sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante
- **H_1:** El mercurio (50 ppm) no presenta un impacto negativo sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante

c. Nivel de significancia

Definimos el porcentaje de error: $\alpha = 0,05 = 5\%$

d. Elección de la prueba estadística

Se aplicará la prueba t-Student para muestras relacionadas, debido a que se comparan mediciones de crecimiento antes y después de la exposición al mercurio en la misma cepa de *A. dulcitum*. Esta prueba permite identificar si existe una variación significativa atribuible al metal en la concentración evaluada.

e. Lectura de p-valor

Prueba de Normalidad

Se desarrolla la prueba de normalidad de Shapiro Wilk para muestras limitadas menores de 30. Tomándose los siguientes criterios para su determinación:

- p-valor $\geq 0,05$ aceptamos H_0 = Los datos provienen de una distribución regular.
- p-valor $< 0,05$ Aceptamos H_1 = los datos no provienen de una distribución regular.

Tabla 11

Prueba de normalidad de absorción de mercurio por A. dulcitum

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Inicio_Concentración_de_Mercurio	,246	3	.	,970	3	,665
Fin_Concentración_de_Mercurio	,346	3	.	,836	3	,205

a. Corrección de significación de Lilliefors

Como p-valor es 0,665 y 0,205 $\geq \alpha$, donde $\alpha = 0,05$. Se admite la hipótesis nula donde los datos de concentración de mercurio al inicio y final derivan de una distribución normal.

f. Decisión estadística

Tabla 12

Resumen de la Prueba t-Student para muestras relacionadas para mercurio

	Diferencias emparejadas					T	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Inicio_Concentración_de_Mercurio - Fin_Concentración_de_Mercurio	16,31667	7,14463	4,12495	-1,43158	34,06491	3,956	2	,058

h. Interpretación

En la prueba t-Student para muestras asociadas, se evidencia que el nivel de significancia (Sig. bilateral) es 0,058, el cual es mayor que el α de 0,05. Esto indica que los datos evidenciados no son estadísticamente relevantes, por lo que se acepta la hipótesis nula (H_0). En otras palabras, no se tiene suficiente prueba estadística para afirmar que la concentración de mercurio ha cambiado significativamente entre la medición inicial y final. Por lo tanto, a un nivel de significación del 5%, los resultados sugieren que la levadura psicrotolerante no muestra una variación significativa en su respuesta a la concentración de mercurio entre el inicio y el final del experimento.

4.2.2 Efecto del Cadmio

Con el fin de verificar estadísticamente si la concentración de cadmio (100 ppm) influye en el crecimiento de la levadura psicrotolerante *Apiotrichum dulcitum* aislada de la Laguna Shucshapa (Oyón, Lima), se realiza a continuación la contrastación de hipótesis a través de una prueba inferencial. Este análisis permite complementar la interpretación experimental del crecimiento con un sustento estadístico que respalda o rechaza el efecto del metal evaluado.

a. Hipótesis del investigador

El cadmio (100 ppm) influye sobre en el crecimiento de la levadura psicrotolerante

b. Redacción de la hipótesis

- **H_0:** El cadmio (100 ppm) presenta un impacto negativo sobre en el crecimiento de la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima
- **H_1:** El cadmio (100 ppm) no presenta un impacto negativo sobre en el crecimiento de la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima

c. Nivel de significancia

Definimos el porcentaje de error: $\alpha = 0,05 = 5\%$

d. Elección de la prueba estadística

Se aplicará la prueba t-Student para muestras relacionadas, debido a que se comparan mediciones de crecimiento antes y después de la exposición al mercurio en la misma cepa de *A. dulcitum*. Esta prueba permite identificar si existe una variación significativa atribuible al metal en la concentración evaluada.

e. Lectura de p-valor

Prueba de Normalidad

Se efectua la prueba de normalidad de Shapiro Wilk para muestras pequeñas menores de 30. Tomándose los siguientes criterios para su determinación:

- p-valor $\geq 0,05$ aceptamos H_0 = Los datos provienen de una distribución regular.
- p-valor $< 0,05$ Aceptamos H_1 = los datos no provienen de una distribución regular.

Tabla 13

Prueba de normalidad de absorción de cadmio por A. dulcitum

	Pruebas de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Inicio_Concentración_de_Cadmio	,277	3	.	,941	3	,531
Fin_Concentración_de_Cadmio	,195	3	.	,996	3	,881

a. Corrección de significación de Lilliefors

Como p-valor es 0,531 y 0,881 $\geq \alpha$, donde $\alpha = 0,05$. Se acepta la hipótesis nula donde los datos de concentración de cadmio al inicio y final provienen de una distribución normal.

f. Decisión estadística

Tabla 14

Resumen de la Prueba t-Student para muestras relacionadas para cadmio

	Diferencias emparejadas							
				95% de intervalo de confianza de la diferencia				
	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio	Inferior	Superior	t	gl	Sig. (bilateral)
Inicio_Concentración_de_Cadmio - Fin_Concentración_de_Cadmio	53,30333	5,58591	3,22503	39,42715	67,17951	16,528	2	,004

h. Interpretación

En la prueba t-Student para muestras emparejadas, se evidencia que el nivel de significancia (Sig. bilateral) es 0,004, el cual es menor que el α de 0,05. Esto indica que los datos registrados son estadísticamente significativos, por lo que se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis de investigación. Por lo tanto, a un nivel de significación del 5%, se tiene suficiente evidencia estadística para confirmar que la levadura psicrotolerante ha influido en la reducción de la concentración de cadmio, lo que sugiere su potencial aplicación en procesos de biorremediación en ambientes contaminados con este metal pesado.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

5.1 Discusión de resultados

La caracterización microbiológica de la levadura aislada de la Laguna Shucshapa confirma la existencia de microorganismos psicrotolerantes en ambientes altoandinos sometidos a bajas temperaturas, estrés geoquímico y limitada disponibilidad de nutrientes. Estas condiciones ambientales generan presiones selectivas que favorecen la supervivencia de microorganismos especializados, tal como se observa en la cepa aislada e identificada molecularmente como *Apiotrichum dulcitum*. El crecimiento registrado a temperaturas frías corrobora que las levaduras psicrotolerantes pueden sobrevivir a rangos cercanos a 0 °C, pero mantienen su óptimo entre 20 °C y 30 °C, tal como reportan Arenas (2022) y Vázquez et al. (2022). La prolongación de la fase logarítmica hasta el décimo día y el máximo de biomasa alcanzado reflejan un metabolismo lento, característico de organismos adaptados a condiciones extremas (Giambartolomei, 2021).

El aislamiento exclusivo de *A. dulcitum* puede explicarse no solo por la baja temperatura, sino también por la escasa disponibilidad de carbono y las propiedades fisicoquímicas del agua, que actúan como factores de selección microbiana. Esto concuerda con lo descrito por Ibarra (2017), quien señala que los ecosistemas fríos y oligotróficos limitan la diversidad microbiana, favoreciendo únicamente organismos con adaptaciones fisiológicas específicas. En este estudio, tales adaptaciones se evidencian también en la resistencia estructural observada mediante tinciones microscópicas, donde la pared celular Gram positiva, rica en quitina y glucanos, sugiere un refuerzo protector frente al estrés ambiental y sustancias tóxicas.

Desde el ámbito bioquímico, la actividad lipolítica y amilolítica detectada demuestra que *A. dulcitum* posee la capacidad de utilizar compuestos orgánicos complejos, lo que representa una ventaja ecológica en ambientes acuáticos con baja disponibilidad de carbono fácilmente asimilable. La ausencia de actividad celulasa indica una restricción metabólica hacia la degradación de celulosa, sugiriendo preferencia por fuentes de carbono de estructura menos rígida. Este patrón ha sido descrito en otras levaduras acuáticas con funciones de reciclaje biológico en ecosistemas fríos (Vázquez et al., 2022).

En relación con la adaptación a metales pesados, el comportamiento diferencial observado muestra una resistencia moderada frente a Hg^{2+} y Cd^{2+}, junto con sensibilidad marcada ante concentraciones elevadas de Cr^{6+} y Cu^{2+}. Este perfil selectivo coincide con estudios que

demostraron que algunas levaduras pueden activar mecanismos de bioadsorción en la pared celular, secuestro intracelular y detoxificación enzimática que reducen la toxicidad del metal (Vázquez et al., 2022). La baja tolerancia hacia Cr^{6+} y Cu^{2+} puede explicarse por su capacidad oxidante y desestabilizadora de membranas, lo que genera estrés oxidativo severo, bloqueos metabólicos y pérdida de viabilidad celular (Sethupathy et al., 2022).

La interpretación estadística aplicada a la interacción con Hg^{2+} (50 ppm) demuestra que la levadura puede crecer en presencia del metal, pero sin modificar significativamente su concentración en el medio, lo que indica que *A. dulcitum* tolera el mercurio, pero no lo transforma ni remueve de forma efectiva. Esto contrasta con especies como *Candida tropicalis* y *Rhodotorula mucilaginosa*, que sí han evidenciado capacidad de biosorción y reducción química de este metal (Huang *et al*., 2020; Bhattacharyya et al., 2022). La ausencia de remoción significativa puede asociarse a la alta afinidad del mercurio por proteínas con grupos sulfhidrilo, lo que interfiere con procesos metabólicos involucrados en la biotransformación (Martínez et al., 2021).

En contraste, la interacción con Cd^{2+} (100 ppm) mostró una remoción estadísticamente significativa, demostrando que *A. dulcitum* no solo tolera el metal, sino que participa activamente en su eliminación del medio. Esta respuesta concuerda con reportes que destacan a *Yarrowia lipolytica* y *Saccharomyces cerevisiae* como especies capaces de retener Cd^{2+} mediante mecanismos de bioadsorción en la pared celular, formación de complejos intracelulares y biotransformación (Sánchez-Rojas et al., 2023; Wang et al., 2023). En consecuencia, la actividad observada posiciona a *A. dulcitum* como un candidato prometedor para aplicaciones biotecnológicas de biorremediación de cadmio en ecosistemas fríos afectados por actividad minera.

En conjunto, los hallazgos de esta investigación demuestran que *Apiotrichum dulcitum* posee características morfológicas, metabólicas y fisiológicas que le permiten sobrevivir en ambientes extremo-mineros altoandinos, mostrando además un potencial selectivo de biorremediación frente a Cd^{2+}. No obstante, su baja eficiencia frente a Cr^{6+}, Cu^{2+} y Hg^{2+} sugiere que su aplicación debe ser planteada como parte de estrategias complementarias, preferentemente en consorcio con otras levaduras o bacterias metalotolerantes para el tratamiento integral de aguas contaminadas.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusión

El aislamiento microbiológico realizado a partir de muestras de agua superficial de la Laguna Shucshapa permitió obtener una levadura psicrotolerante viable bajo condiciones de baja temperatura, evidenciando la presencia de microorganismos adaptados a ambientes altoandinos impactados por actividad minera. La cepa aislada mostró crecimiento sostenido a 5 °C durante el proceso de enriquecimiento, lo que confirma su carácter psicrotolerante y su capacidad de adaptación a condiciones ambientales extremas. La caracterización morfológica reveló colonias homogéneas y células ovaladas en gemación, compatibles con levaduras ambientales. Los ensayos bioquímicos evidenciaron un perfil metabólico funcional, mientras que la identificación molecular mediante secuenciación del ARN ribosomal y análisis BLAST permitió clasificar la cepa como *Apiotrichum dulcitum* con un 99,66 % de similitud genética. Estos resultados confirman que la Laguna Shucshapa alberga levaduras psicrotolerantes con características fisiológicas y genéticas bien definidas, lo que sustenta su relevancia ecológica y su potencial para estudios posteriores de aplicación biotecnológica en ambientes degradados por metales pesados.

La evaluación pre-experimental del impacto de los metales pesados sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante *Apiotrichum dulcitum* evidenció una respuesta diferencial según el tipo de metal y la concentración aplicada. Los ensayos realizados en medio líquido YPG suplementado mostraron que la presencia de cromo hexavalente inhibió completamente el crecimiento de la levadura, confirmando su elevada toxicidad y baja tolerancia biológica. En el caso del cobre y el mercurio, se observó un crecimiento limitado únicamente a bajas concentraciones, reflejado en valores reducidos de absorbancia y biomasa seca, lo que indica un efecto inhibitorio progresivo sobre la actividad metabólica celular. En contraste, frente al cadmio, la levadura mantuvo un crecimiento más estable, sugiriendo una mayor capacidad de adaptación fisiológica ante este metal. Estos resultados demuestran que los metales pesados influyen significativamente en el crecimiento de *Apiotrichum dulcitum*, afectando su desarrollo de manera dependiente del metal evaluado, y evidencian que la levadura presenta una tolerancia selectiva que condiciona su desempeño biológico en ambientes contaminados.

El análisis del efecto de la concentración de metales pesados sobre la levadura psicrotolerante *Apiotrichum dulcitum* demostró que la respuesta biológica estuvo directamente condicionada por el incremento gradual de las dosis evaluadas. A medida que aumentaron las concentraciones de cadmio, cobre y mercurio en el medio de cultivo, se evidenció una disminución progresiva del crecimiento microbiano, reflejada en la reducción de la absorbancia y de la biomasa producida, lo que confirma un efecto tóxico dependiente de la dosis. En particular, el cromo hexavalente mostró un efecto inhibitorio marcado incluso a concentraciones bajas, mientras que el cobre y el mercurio generaron una respuesta negativa más gradual. En contraste, frente al cadmio, se observó una respuesta distinta, ya que la levadura mantuvo actividad metabólica y contribuyó a la reducción de su concentración en el medio, registrándose diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones iniciales y finales. Estos resultados indican que la concentración de metales pesados es un factor determinante en la tolerancia y desempeño fisiológico de *Apiotrichum dulcitum*, condicionando su potencial aplicación en procesos de biorremediación.

6.2 Recomendaciones

- Profundizar en estudios de tolerancia y bioacumulación de metales pesados en *Apiotrichum dulcitum*, ampliando el rango de concentraciones, tiempos de exposición y condiciones fisicoquímicas. Esto permitirá determinar con mayor exactitud su capacidad de remoción, así como los límites de toxicidad para cada metal evaluado (Cd, Hg, Cr y Cu).

- Realizar análisis moleculares y bioquímicos que permitan identificar genes, proteínas y rutas metabólicas implicadas en la detoxificación o transformación de metales pesados. Dichos estudios facilitarán la comprensión de los mecanismos de resistencia, adsorción o biotransformación y aportarán bases sólidas para su empleo en biorremediación.

- Evaluar el potencial de *Apiotrichum dulcitum* en sistemas de biorremediación a escala piloto o en condiciones ambientales reales, aplicándolo directamente a cuerpos de agua o suelos contaminados. Ello permitirá validar su eficacia en escenarios naturales y determinar su viabilidad como agente biotecnológico para el tratamiento sostenible de ambientes impactados por metales pesados.

- Incorporar estudios sobre la reducción directa de la concentración de metales en presencia de la levadura, relacionando cuantitativamente el crecimiento microbiano con la disminución de la concentración de los metales. Esto permitirá validar científicamente su posible rol en procesos de remoción y aportar evidencia concreta de su aplicación ambiental.

- Se sugiere implementar estudios experimentales avanzados orientados a evaluar de forma cuantitativa y sistemática la influencia de los microorganismos psicrotolerantes en la reducción de la concentración de metales pesados en sistemas acuáticos contaminados. Estas investigaciones deberían considerar el análisis del comportamiento cinético de remoción, la variación de la eficiencia en función de parámetros fisicoquímicos del medio y la comparación entre sistemas con y sin presencia microbiana. Asimismo, resulta pertinente incorporar enfoques analíticos y moleculares que permitan identificar y diferenciar los mecanismos de interacción microorganismo–metal involucrados en el proceso. El desarrollo de estos estudios permitirá fortalecer la base científica para la aplicación de microorganismos psicrotolerantes en tecnologías de biorremediación ambiental.

CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry, 2019*, 1-14. https://doi.org/10.1155/2019/6730305

Amnistía Internacional. (2021). *Perú: Nueva evidencia confirma crisis sanitaria por metales tóxicos en Espinar*. Disponible en: https://www.amnesty.org/es/ultimas/noticias/2021/05/peru-crisis-de-salud-metales-toxicos-espinar/ .

Arrieta, L. K. (2021). Biosorción de metales pesados por hongos filamentosos, aislados de cuerpos de agua altoandinos contaminados con relaves mineros de la sierra central del Perú. *Tesis de licenciatura*, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Disponible en https://1library.co/document/z1g746pz-biosorcion-metales-pesados-filamentosos-aislados-altoandinos-contaminados-central.html

Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., & McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology, 14*(4), 176-182. https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006

Barman, D., & Jha, D. K. (2021). Metallotolerant microorganisms and microbe-assisted phytoremediation for a sustainable clean environment. In Singh, R. P., Manchanda, G., Bhattacharjee, K., & Panosyan, H. (Eds.), *Microbes in microbial communities* (pp. 327-344). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5617-0_15

Barman, D., Jha, D. K., & Bhattacharjee, K. (2020). Metallotolerant bacteria: Insights into bacteria thriving in metal-contaminated areas. In Singh, R. P., Manchanda, G., Maurya, I., & Wei, Y. (Eds.), *Microbial versatility in varied environments* (pp. 201-217). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3028-9_9

Bhattacharyya, K., Sen, D., & Dey, B. (2022). Isolation and characterization of heavy metals and non-metallic pollutant-tolerant microorganism from wastewater of Tollygunge Canal (Kolkata) West Bengal, India. *Biologia, 77*, 2359-2369. https://doi.org/10.1007/s11756-022-01086-8

Bhattacharyya, K., Sen, D., & Dey, B. et al. (2022). Isolation and characterization of heavy metals and non-metallic pollutant-tolerant microorganism from wastewater of Tollygunge Canal (Kolkata) West Bengal, India. *Biologia*, 77, 2359-2369. https://doi.org/10.1007/s11756-022-01086-8

Custodio, M., Fow, A., De la Cruz, H., Chanamé, F., & Huarcaya, J. (2024). *Potential ecological risk from heavy metals in surface sediment of lotic systems in central region Peru*. Frontiers in Water, 5, 1295712. https://doi.org/10.3389/frwa.2023.1295712

Fandiño Piñeiro, X., Ave, M. T., Mallah, N., Caamaño-Isorna, F., Guisández Jiménez, A. N., Vieira, D. N., Bianchini, F., & Muñoz-Barús, J. I. (2021). *Heavy metal contamination in Peru: Implications on children's health*. Scientific Reports, 11, 22729. https://doi.org/10.1038/s41598-021-02163-9

Fonseca, Á., Vieira, S., & Rosa, C. A. (2019). Cold-adapted yeasts and their biotechnological applications. *FEMS Microbiology Reviews, 43*(3), 1-17. https://doi.org/10.1093/femsre/fuy043

Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management, 92*(3), 407-418. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011

Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management, 92*(3), 407-418. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011

Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology, 156*(3), 609-643. https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0

George, L.-L. S., & Belcher, Á. M. (2020). Engineered yeast as a method for bioremediation. *Massachusetts Institute of Technology*, (number US10766798B2, September 8). USA Patent. https://patents.google.com/patent/US10766798B2/en

Gutiérrez, C., & Ballester, A. (2002). *La incorporación de metales pesados en las bacterias y su potencial aplicación en biorremediación*. Interciencia, 27(4), 158-164. https://www.redalyc.org/pdf/339/33906702.pdf

Huang, Y., Li, X., Zhang, J., & Wang, Y. (2020). Isolation and characterization of psychrotolerant microorganisms from heavy metal-contaminated waters in the Yangtze River, Hubei, China. *Environmental Science and Pollution Research, 27*(35), 44117-44129. https://doi.org/10.1007/s11356-020-10420-3

Huang, Y., Li, X., Zhang, J., & Wang, Y. (2020). Isolation and characterization of psychrotolerant microorganisms from heavy metal-contaminated waters in the Yangtze River, Hubei, China. *Environmental Science and Pollution Research, 27*(35), 44117-44129. https://doi.org/10.1007/s11356-020-10420-3

Hussein, H., Farag, S., Kandil, K., & Moawad, H. (2005). Tolerance and uptake of heavy

metals by Pseudomonads. *Process Biochemistry, 40*(3-4), 955-961. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.02.015

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology, 7*(2), 60-72. https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009

Krishnendu, M., Moitri, L., Urmi, H., & Rajib, B. (2021). Isolation and characterization of copper tolerant bacterial species habituating in copper mines and study of their potentiality as a plant growth stimulator. *Research Square*. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-705506/v1.

Margesin, R., & Schinner, F. (2020). Adaptations of microorganisms to cold environments. *Environmental Microbiology Reports, 12*(2), 214-222. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12847

Martínez, L., Rojas, D., & Alarcón, C. (2021). Tolerance and heavy metal removal potential of Pichia kudriavzevii isolated from the Alalay Lagoon, Cochabamba, Bolivia. *Journal of Environmental Management, 290*, 112661. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112661

Martínez, L., Rojas, D., & Alarcón, C. (2021). Tolerance and heavy metal removal potential of *Pichia kudriavzevii* isolated from the Alalay Lagoon, Cochabamba, Bolivia. *Journal of Environmental Management, 290*, 112661. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112661

Mederos da Silveira, S. (2018). *Bioprospecção de substâncias antimicrobianas em isolados psicrotolerantes e termotolerantes da região Antártica* [Trabajo de conclusión de curso, Universidade Federal do Rio de Janeiro]. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ. https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/19384/1/SMSilveira.pdf

Muñoz, A. J., Ruiz, E., Abriouel, H., Galvez, A., Ezzouhri, L., & Lairini, K. (2012). Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption. *Chemical Engineering Journal*, 210, 325-332. https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.09.007

Muñoz-Silva, L., Olivera-Gonzales, P., Santillán-Torres, M., & Tamariz-Angeles, C. (2019). Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú). *Revista Peruana de Biología, 26*(1), 109-118. https://doi.org/10.15381/rpb.v26i1.15263

Nguyen KCT, Nguyen PV, Truong HTH. Heavy Metal Tolerance of Novel *Papiliotrema* Yeast Isolated from Vietnamese Mangosteen. Mycobiology. 2020 Jun 2;48(4):296-303. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7476527/

Olivares Alcántara, V. M. (2012). *Acciones de evaluación ambiental realizada por esta Dirección en la cuenca del río Huaura*. OEFA. https://repositorio.oefa.gob.pe/handle/20.500.12788/1121

Olivares Alcántara, V. M. (2012). Acciones de evaluación ambiental realizada por esta Dirección en la cuenca del río Huaura. *Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (OEFA)*. https://repositorio.oefa.gob.pe/handle/20.500.12788/1121

Report SPDA Actualidad Ambiental. (2010). Utilizan ´bacterias eficaces´ para descontaminar el Lago Titicaca. Disponible en: https://www.actualidadambiental.pe/inician-proyecto-experimental-para-descontaminar-lago-titicaca-2/#:~:text=La%20Municipalidad%20de%20Puno%20pondr%C3%A1%20en%20marcha%20un,a%20los%20organismos%20t%C3%B3xicos%20que%20se%20encuentren%20all%C3%AD. Accedido en 27 Julio 2023.

Química Viva. (2003). *Metales pesados y su impacto ambiental.* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm

Rivera, I. G. (2021). Evaluación de la concentración de los metales pesados (arsénico, plomo y zinc) en las aguas superficiales de la Laguna Patón, (Oyón, Perú) (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Científica del Sur, Perú.
https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/USUR_75fc88afd5cc506d121efa049cea8b4a

Sánchez-Rojas, T. L., Macedo-Prada, D., Ramírez, P. S., Arrieta, L. K., Durán, Y., Flores, A., Manya, W. F., & Guerra, G. (2023). Cepas de *Yarrowia lipolytica* aisladas de lagunas altoandinas del Perú contaminadas con relaves mineros, como potenciales agentes para la biorremediación de metales pesados. *Ecología Aplicada, 22*(1), 1-12. https://doi.org/10.17268/ea.2023.01.001

Sánchez-Rojas, T. L., Macedo-Prada, D., Ramírez, P. S., Arrieta, L. K., Durán, Y., Flores, A., Manya, W. F., & Guerra, G. (2023). *Cepas de Yarrowia lipolytica aisladas de lagunas altoandinas del Perú contaminadas con relaves mineros, como potenciales agentes para la biorremediación de metales pesados*. Ecología Aplicada, 22(1), 1-12. https://doi.org/10.17268/ea.2023.01.001

Segal-Kischinevzky, C., Romero-Aguilar, L., Alcaraz, L. D., López-Ortiz, G., Martínez-Castillo, B., Torres-Ramírez, N., Sandoval, G., & González, J. (2023). *Yeasts inhabiting extreme environments and their biotechnological applications*. Microorganisms, 11(1), 120. **https://doi.org/10.3390/microorganisms10040794**

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. In A. Luch (Ed.), *Molecular, clinical and environmental toxicology* (pp. 133-164). Springer. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22945569/

United States Environmental Protection Agency – EPA, National Center for Environmental Assessment & Integrated Risk Information System - IRIS. (2004). Chemical assessment summary. Disponible en: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/search/index.cfm. Consultado el 28 de julio de 2023.

Valls, M., & de Lorenzo, V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews, 26*(4), 327-338. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00617.x

Valls, M., & de Lorenzo, V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews, 26*(4), 327-338. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00617.x

Villacorta, Ch. S. P., Chira, F. J. E., Ochoa, Z. M. B., Sánchez, D. M., Pari, P. W., & Valencia, M. M. (2010). Estudio geoambiental de la cuenca del río Huaura, Boletín N° 41 Serie C Geodinámica e Ingeniería Geológica INGEMMET. Disponible en: https://repositorio.ingemmet.gob.pe/handle/20.500.12544/246

Volesky, B. (2007). Biosorption and me. *Water Research, 41*(18), 4017-4029. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.062

Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorption of heavy metals by Saccharomyces cerevisiae: A review. *Biotechnology Advances, 27*(2), 195-226. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002

Wang, N., Wang, Y., Li, B., Huang, F., Sun, C., Li, X., Zhao, R., & Wang, Y. (2023). Characteristics of a copper-cadmium tolerant strain screened from tailings and its potential in remediation of heavy metal contaminated soil. *Water, Air, & Soil Pollution Journal*, 234(277), 1-13. https://doi.org/10.1007/s11270-023-06296-7

Wang, N., Wang, Y., Li, B., Huang, F., Sun, C., Li, X., Zhao, R., & Wang, Y. (2023). Characteristics of a copper-cadmium tolerant strain screened from tailings and its potential in remediation of heavy metal contaminated soil. *Water, Air, & Soil Pollution*

Journal, 234(277), 1-13. https://doi.org/10.1007/s11270-023-06296-7

ANEXOS

ANEXO 01. FICHA GENERAL DE RECOLECCIÓN DE MUESTRA

FICHA GENERAL DE RECOLECCIÓN DE MUESTRA								
Institución	Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión		**Proyecto**	Efecto de metales pesados sobre una levadura psicrotolerante aislada de la laguna Shucshapa Oyón, Lima			**Codigo de muestra**	LS-L1, LS-L2, LS-L3, LS-L4 y LS-L5
Zona de muestreo	Centro de la laguna.	Borde noreste	Borde noroeste	Borde suroeste	Borde sureste	**Fecha de muestreo**	16/01/2024	**Hora de muestreo**
Condiciones meteorológicas	**Temperatura ambiental**	**Humedad relativa**	**Velocidad del viento**	**Presión atmosférica**	**Ubicación georreferenciada:**			9:30 -10:00 a.m.
					Latitud	**Longitud**	**Altitud**	
	6.5°C	34.10%	1.6 m/s	550 hPa	10°30'11.5"S	76°44'55.5"O	4283.8 msnm	
Características del cuerpo de agua								
Temperatura del agua	**Conductividad eléctrica**	**Dióxido de carbono**	**Oxigeno disuelto**	**Presencia de MO**	**pH**	**Cloruros**	**Turbidez**	**Olor y Color**
								ausencia
6.0 - 6.5°C	180 µS/cm	7 ppm	8.5 mg/L	Baja	6.8 - 7.2	12 ppm	2.5 NTU	Transparente
Tipo de muestra								
Medio de recolección	**Profundidad de muestreo**	**Volumen recolectado por muestra**		**Número de réplicas por punto**		**Material de recolección**	**Conservación de la muestra**	
Agua superficial	15 cm	100 mL por frasco		Unidad		Frascos estériles de polietileno de 100 mL	Transporte refrigerado a 4°C en caja térmica hermética	
Procedimiento de muestreo								
Método de recolección	**Instrumentos utilizados**							
	GPS Garmin Rino 110	Termómetro digital	pH-metro portátil	Turbidímetro	Oximetro portátil	Conductímetro	Kit Fresh Water Aquaculture	

Observaciones adicionales	Condiciones ambientales: Parcialmente nublado, con vientos moderados. Presencia de contaminantes visibles: No se observaron residuos sólidos o contaminación visible. Presencia de flora y fauna en la zona: Vegetación circundante tipica de ecosistemas altoandinos, con presencia de aves acuáticas. Anomalias en la muestra: Sin anomalías visibles, agua transparente sin particulas en suspensión.

Responsables	**Funcion**	**Fecha**	**Hora**	**Firma**
Angela Melissa Morán Suárez	Recolector	16/01/2024	10:00	
Yesenia Judith Arias Salvador De Cueva	Transportista	16/01/2024	10:00	

ANEXO 02. FICHA DE CADENA DE CUSTODIA DE MUESTRAS

FICHA DE CADENA DE CUSTODIA DE MUESTRAS								
Fecha y Hora		16/01/2024 – 09:30 h		**Tipo de muestra**	Agua superficial	Lugar de muestreo	Laguna Shucshapa	
Condiciones ambientales		**Temperatura**	**Humedad**	**Velocidad**	**Parametro In Situ**	**Cloruros**	**pH**	**CO_2**
		6.2 °C	34%	1.5 m/s		12 ppm	6.9	7 ppm
Conservacion					**Transporte**			
Envase utilizado		Frasco de polietileno estéril de 100 mL			**Tiempo máximo de transporte:**		6 horas	
Condición de conservación		Refrigeración portátil a 4 °C ± 2			**Observaciones durante el traslado**		No se reportaron incidencias	
Codigo de muestra	**X (m)**	**Y (m)**	**Zona**	**ALTITUD (m s. n. m.)**	**PROFUNDIDAD (cm)**	**DESCRIPCIÓN**	**PARAMETROS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA**	
LS-L1	308613,7	8838419	18	4283,8	15	Centro de la laguna	T°	6 a 6.5 °C
LS-L2	308615,8	8838426	18	4283,8	15	Borde noreste	pH	6.8 a 7.2
LS-L3	308611,4	8838425	18	4283,8	15	Borde noroeste	[ ]CO2	7 ppm
LS-L4	308612,9	8838411	18	4283,8	15	Borde suroeste	[ ] Cl^-	12 ppm
LS-L5	308617,2	8838413	18	4283,8	15	Borde sureste		

Responsables	Funcion	Fecha	Hora	Firma
Angela Melissa Morán Suárez	Recolector	16/01/2024	10:00	
Yesenia Judith Arias Salvador	Transportista	16/01/2024	10:00	
Responsable de Microbiología	Receptor en laboratorio	16/01/2024	14:15	-

Observaciones:	La muestra fue recolectada bajo protocolos estandarizados (MINAM, 2011; NTP ISO 5667-3:2019), con georreferenciación mediante GPS Garmin Rino 110. Los frascos se mantuvieron en refrigeración controlada durante todo el traslado. La custodia fue asumida en todo momento por las tesistas responsables, garantizando la trazabilidad y la validez científica de la muestra.

ANEXO 03. Data y análisis estadístico



Archivo Editar Ver Datos Transformar Analizar Gráficos Utilidades Ampliaciones Ventana Ayuda

10 :

	Inicio_Concentración_de_Mercurio	Fin_Concentración_de_Mercurio	Inicio_Concentración_de_Cadmio	Fin_Concentración_de_Cadmio
1	48,53	35,20	100,00	52,34
2	45,25	34,10	98,65	45,23
3	50,27	25,80	95,23	36,40

Figura 15. Registro de datos en SPSS de las concentraciones iniciales y finales de mercurio y cadmio en las muestras tratadas con la levadura *A. dulcitum*, utilizados para el análisis estadístico de reducción de metales pesados.

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Inicio_Concentración_de_Mercurio	,246	3	.	,970	3	,665
Fin_Concentración_de_Mercurio	,346	3	.	,836	3	,205
Inicio_Concentración_de_Cadmio	,277	3	.	,941	3	,531
Fin_Concentración_de_Cadmio	,195	3	.	,996	3	,881

a. Corrección de significación de Lilliefors

Figura 16. Pruebas de normalidad aplicadas a las concentraciones iniciales y finales de mercurio y cadmio en las muestras tratadas con *A. dulcitum.*

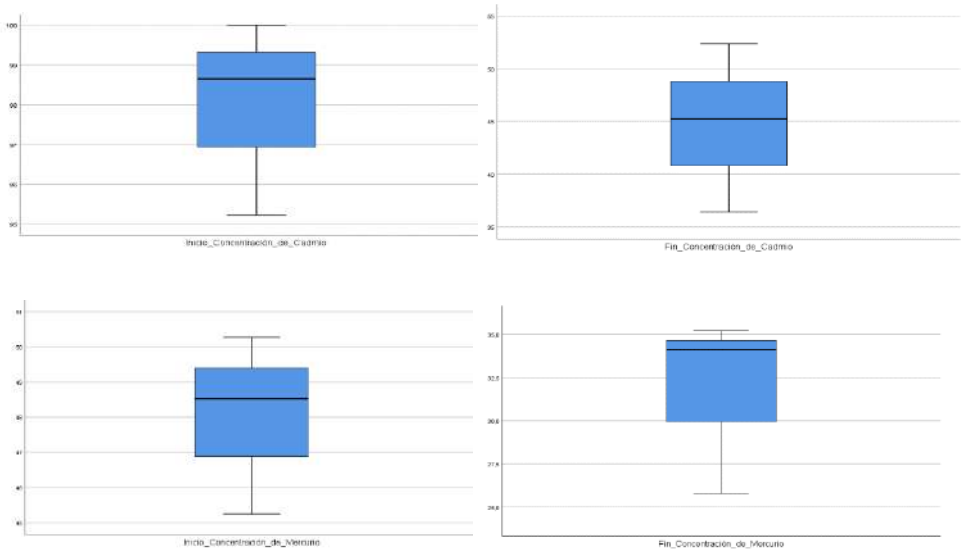


Figura 17. Diagramas de caja de las concentraciones iniciales y finales de cadmio y mercurio en las muestras tratadas con *A. dulcitum.*

ANEXO 04. Galería fotográfica



Figura 18. Observación y caracterización morfológica de la levadura bajo microscopio óptico compuesto, efectuada por las tesistas como parte del proceso de identificación microbiológica.



Figura 19. Sales minerales utilizadas como fuente de metales pesados ($K_2Cr_2O_7$ para cromo, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ para cobre, $HgCl_2$ para mercurio y $CdCl_2 \cdot H_2O$ para cadmio), previo a la preparación del medio de cultivo YPG para los ensayos de tolerancia de la levadura *A. dulcitum*



Figura 20. Preparación del medio de cultivo YPG suplementado con cadmio para los ensayos de tolerancia de la levadura *A. dulcitum*.

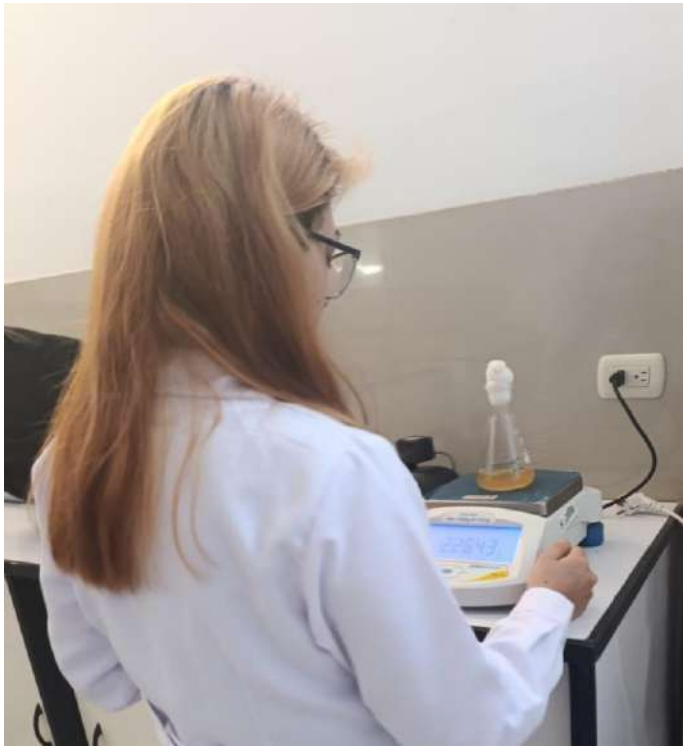


Figura 21. Medición del peso húmedo de la biomasa de *A. dulcitum* tras el crecimiento en medio YPG suplementado con metales pesados, previo a la determinación del peso seco conforme a la metodología descrita.

ANEXO 05. Matriz de consistencia

EFECTO DE METALES PESADOS SOBRE UNA LEVADURA PSICROTOLERANTE AISLADA DE LA LAGUNA SHUCSHAPA OYÓN, LIMA

Problema	Objetivo	Hipótesis	Variable	Operacionalización de variables			Métodos y técnicas
				Dimensión	Indicadores	Escala	
PROBLEMA GENERAL ¿Cuál es efecto de metales pesados (cromo, cobre, mercurio y cadmio) sobre la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima?	**OBJETIVO GENERAL** Determinar el efecto de metales pesados (cromo, cobre, mercurio y cadmio) sobre la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima	**HIPÓTESIS GENERAL** Los metales pesados (cromo, cobre, mercurio y cadmio) ejercen un efecto negativo sobre una levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima	**V1** Metales Pesados	Tipo	Cromo Cobre Mercurio Cadmio	Razón	**TIPO DE INVESTIGACIÓN** Descriptiva,Cualitativa-Cuantitativa y Básica-Aplicada. **POBLACIÓN Y MUESTRA** ***. Población*** Laguna Shucshapa Oyón – Lima. ***Muestra.*** Muestras de diferentes puntos de Laguna Shucshapa. **PROCEDIMIENTO** ● Recopilación bases teóricas. ● Aislamiento y caracterización. ● Ensayos de tolerancia a metales pesados. **TÉCNICAS** ● Técnicas de observación. ● Técnicas experimentales. **INSTRUMENTOS** ● **Observación:** Fichas de observación en los ensayos de tolerancia instrumentos para el análisis estadístico.
						Razón	
				Concentración	ppm	Razón	
PROBLEMAS ESPECÍFICOS ¿Cómo es el aislamiento y caracterización de la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima?	**OBJETIVO ESPECÍFICOS** Describir el aislamiento y caracterización de la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima	**HIPÓTESIS ESPECÍFICOS** Se describirá el aislamiento y caracterización de levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima	**V2** Levaduras psicrotolerante	Parámetros	Potencial de hidrogeno (pH) Temperatura (C°)	Razón	
¿Cuál es el efecto de metales pesados sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima?	Determinar el efecto de metales pesados sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima	Los metales pesados ejercen un efecto negativo sobre el crecimiento de la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima		Morfología	Tinciones	Razón	
¿Cuál es el efecto de la concentración de metales pesados sobre la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima?	Determinar el efecto de la concentración de metales pesados sobre la levadura psicrotolerante de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima	La concentración de metales pesados ejerce un efecto negativo sobre la levadura psicrotolerante aislada de la Laguna Shucshapa Oyón, Lima		Crecimiento	Biomasa		

ANEXO 06. Validaciones de juicios de expertos

VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS MEDIANTE JUICIO DE EXPERTO

I. DATOS GENERALES

a. **Título de la investigación:** "Efecto de metales pesados sobre una levadura psicrotolerante aislada de la laguna Shucshapa Oyón, Lima".

b. **Instrumentos a evaluar:**
- ✓ Ficha general de recolección de muestras y Ficha de Cadena de Custodia de muestras.

c. **Fecha de validación:** 01 de junio del 2024

d. **Apellidos y nombres del juez experto:** Arévalo Villafuerte Yennifeer Yuliana

e. **DNI:** 72664499

f. **Especialidad de juez experto:** Ing. Ambiental

g. **Grado del juez experto:** Magister

h. **Institución que labora:** Universidad Católica Sedes Sapientiae

II. ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN - JUICIO DE EXPERTO:

Marque con un aspa "X" dentro del cuadro de valoración.

N°	CRITERIOS	ESCALA DE VALORACIÓN				
		1 Muy malo	2 Malo	3 Regular	4 Bueno	5 Muy bueno
1	**Claridad:** Esta formulado con el lenguaje apropiado y comprensible				X	
2	**Objetividad:** Permite medir hechos observables				X	
3	**Actualidad:** Adecuado al avance de la ciencia y la tecnología				X	
4	**Organización:** Presentación ordenada				X	
5	**Suficiencia:** Comprende los aspectos en cantidad y claridad				X	
6	**Pertinencia:** Permite conseguir datos de acuerdo a objetivos				X	
7	**Consistencia:** Permite conseguir datos basados en modelos teóricos				X	
8	**Coherencia:** Hay coherencia entre las variables, indicadores e ítems				X	
9	**Metodología:** La estrategia responde al propósito de la investigación				X	
10	**Aplicación:** Los datos permiten un tratamiento estadístico pertinente				X	

Consideraciones generales	Generalidad				
	1	2	3	4	5
Las instrucciones se entienden y orientan para lograr responder los registros de monitoreo				X	
La secuencia de los ítems es lógica				X	
La cantidad de ítems es la adecuada				X	

III. RECOMENDACIONES: Instrumentos aplicables.

IV. CALIFICACIÓN

Validación: 52/65= 80%



Firma del experto

VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS MEDIANTE JUICIO DE EXPERTO

I. DATOS GENERALES

a. **Título de la investigación:** "Efecto de metales pesados sobre una levadura psicrotolerante aislada de la laguna Shucshapa Oyón, Lima".

b. Instrumentos a evaluar:

✓ Ficha general de recolección de muestras y Ficha de Cadena de Custodia de muestras.

c. Fecha de validación: 01 de junio del 2024

d. Apellidos y nombres del juez experto: Cueva Guevara Omar Cesar

e. DNI: 48308053

f. Especialidad de juez experto: Ing. Ambiental

g. Grado del juez experto: Titulado y Colegiado

h. **Institución que labora:** Peru Offset Digital S.A.C

II. ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN - JUICIO DE EXPERTO:

Marque con un aspa "X" dentro del cuadro de valoración.

N°	CRITERIOS	ESCALA DE VALORACIÓN				
		1 Muy malo	2 Malo	3 Regular	4 Bueno	5 Muy bueno
1	**Claridad:** Esta formulado con el lenguaje apropiado y comprensible				X	
2	**Objetividad:** Permite medir hechos observables				X	
3	**Actualidad:** Adecuado al avance de la ciencia y la tecnología				X	
4	**Organización:** Presentación ordenada				X	
5	**Suficiencia:** Comprende los aspectos en cantidad y claridad				X	
6	**Pertinencia:** Permite conseguir datos de acuerdo a objetivos				X	
7	**Consistencia:** Permite conseguir datos basados en modelos teóricos				X	
8	**Coherencia:** Hay coherencia entre las variables, indicadores e ítems				X	
9	**Metodología:** La estrategia responde al propósito de la investigación				X	
10	**Aplicación:** Los datos permiten un tratamiento estadístico pertinente				X	

Consideraciones generales	Generalidad				
	1	2	3	4	5
Las instrucciones se entienden y orientan para lograr responder los registros de monitoreo				X	
La secuencia de los ítems es lógica				X	
La cantidad de ítems es la adecuada				X	

III. RECOMENDACIONES: Instrumentos aplicables.

IV. CALIFICACIÓN

Validación: 52/65= 80%

OMAR CESAR
CUEVA GUEVARA
Ingeniero Ambiental
CIP N° 245752

Firma del experto

VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS MEDIANTE JUICIO DE EXPERTO

I. DATOS GENERALES

a. **Título de la investigación:** "Efecto de metales pesados sobre una levadura psicrotolerante aislada de la laguna Shucshapa Oyón, Lima".

b. **Instrumentos a evaluar:**

✓ Ficha general de recolección de muestras y Ficha de Cadena de Custodia de muestras.

c. **Fecha de validación:** 01 de junio del 2024

d. **Apellidos y nombres del juez experto:** Gonzales Tarrillo José Randu

e. **DNI:** 45954513

f. **Especialidad de juez experto:** Ing. Ambiental

g. **Grado del juez experto:** Titulado y colegiado

h. **Institución que labora:** Hospital Regional de Huacho, área de salud ambiental

II. ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN - JUICIO DE EXPERTO:

Marque con un aspa "X" dentro del cuadro de valoración.

Nº	CRITERIOS	ESCALA DE VALORACIÓN				
		1 Muy malo	2 Malo	3 Regular	4 Bueno	5 Muy bueno
1	**Claridad:** Esta formulado con el lenguaje apropiado y comprensible				X	
2	**Objetividad:** Permite medir hechos observables				X	
3	**Actualidad:** Adecuado al avance de la ciencia y la tecnología				X	
4	**Organización:** Presentación ordenada				X	
5	**Suficiencia:** Comprende los aspectos en cantidad y claridad				X	
6	**Pertinencia:** Permite conseguir datos de acuerdo a objetivos				X	
7	**Consistencia:** Permite conseguir datos basados en modelos teóricos				X	
8	**Coherencia:** Hay coherencia entre las variables, indicadores e ítems				X	
9	**Metodología:** La estrategia responde al propósito de la investigación				X	
10	**Aplicación:** Los datos permiten un tratamiento estadístico pertinente				X	

Consideraciones generales	Generalidad				
	1	2	3	4	5
Las instrucciones se entienden y orientan para lograr responder los registros de monitoreo				X	
La secuencia de los ítems es lógica				X	
La cantidad de ítems es la adecuada				X	

III. RECOMENDACIONES: Instrumentos aplicables.

IV. CALIFICACIÓN

Validación: 52/65= 80%

JOSE RANDU
GONZALES TARRILLO
INGENIERO AMBIENTAL
Reg. CIP Nº 221419

Firma del experto