



**EVALUACIÓN PROSPECTIVA DE LA
ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN BACTERIAS
PROVENIENTES DE LOS PANTANOS
ARTIFICIALES DE AGUAS RESIDUALES,
SHUSHUFINDI- ECUADOR**

**PROSPECTIVE EVALUATION OF THE
PROTEOLYTIC ACTIVITY IN BACTERIA FROM
THE ARTIFICIAL SWAMPS OF WASTEWATER,
SHUSHUFINDI-ECUADOR**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN HIDROLOGÍA
Y GESTIÓN DE RECURSOS HÍDRICOS**

Presentado por:
Ing. Liliana Carlota Soria Noroña

Dirigido por:
Dr. Eloy García Calvo (UAH)

Alcalá de Henares, a 08 de julio de 2019

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su infinita bondad y amor, por darnos salud y bendecirnos, dándonos la fuerza y la voluntad para cumplir con nuestras metas.

A mis padres por ser grandes ejemplos a seguir, por enseñarme a luchar por mis objetivos y a no rendirme, por el amor y el cariño que diariamente me muestran y por todo su apoyo económico durante mi vida estudiantil.

A mi hermano por darme ánimos durante los momentos de dificultad y por ser un gran compañero y amigo en mi diario vivir.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. JUSTIFICACIÓN. OBJETIVOS.....	11
3. METODOLOGÍA.....	13
3.1. Zona de estudio.....	13
3.2. Tipo y diseño de la investigación.....	14
3.3. Obtención de la muestra.....	14
3.4. Técnicas de recolección de datos.	15
3.4.1. Toma de muestras.....	15
3.4.2. Caracterización física de las muestras de agua.....	15
3.4.3. Diseño de las unidades experimentales para las pruebas de degradación de caseína con bacterias de las aguas residuales de los pantanos artificiales Shushufindi.....	16
3.4.4. Determinación de la actividad proteolítica.....	17
3.4.5. Análisis estadístico.....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1. Caracterización física de las muestras de agua.....	18
4.2. Recuento de las colonias bacterianas.....	21
4.3. Pruebas de degradación de caseína con las bacterias de las lagunas artificiales Shushufindi.....	23
4.4. Determinación del índice de potencia de actividad enzimática.....	23
4.5. 4.5. Evaluación microscópica de los aislados bacterianos.....	27
4.6. Identificación macroscópica y pruebas bioquímicas.....	28
5. CONCLUSIONES.....	30
6. BIBLIOGRAFÍA.....	31

Figura 1 Mapa político de sucumbíos.....	13
Figura 2 Ubicación de los ríos de shushufindi.....	13
Figura 3 Primer pantano Artificial	14

Gráfico 1 Comparación del promedio de los parámetros físicos y químicos de las muestras tomadas con respecto a la normativa vigente.....	20
Gráfico 2 Unidades formadoras de colonia por mililitro vs laguna artificial muestreada	22
Gráfico 3 Porcentaje de aislados bacterianos que mostraron un IPP mayor o igual a 2,50 vs Laguna Artificial.....	26
Gráfico 4 Porcentaje de aislados bacterianos según su forma y diferenciación entre Gram + y Gram -	28

Tabla 1	Parámetros de caracterización física de las muestras de agua	15
Tabla 2	Resultados de la caracterización física de las muestras de agua.	19
Tabla 3	Recuento de las colonias bacterianas UFC/ul	21
Tabla 4	Promedio del recuento bacteriano a las 72 h en UFC/ ml	22
Tabla 5	Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 1	23
Tabla 6	Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 2.....	23
Tabla 7	Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 3.....	24
Tabla 8	Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 4.....	24
Tabla 9	Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 5.....	24
Tabla 10	Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 6.....	24
Tabla 11	Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 7.....	25
Tabla 12	Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 8.....	25
Tabla 13	: Porcentaje de aislados bacterianos que mostraron un IPP mayor o igual a 2,50 por laguna artificial de aguas residuales con tratamiento LD.	26
Tabla 14	Evaluación microscópica de los aislados bacterianos	27
Tabla 15	Género de los clones bacterianos aislados.....	28

RESUMEN

En este trabajo de fin de máster se tuvo como objetivo es evaluar prospectivamente la actividad proteolítica en las bacterias de los pantanos artificiales de aguas residuales, Shushifindi, para esto se tomaron tres muestras representativas de cada una de las ocho lagunas artificiales escogidas, Se analizó física y químicamente de forma ex situ de las muestras tomadas de la última laguna artificial correspondiente a aquella donde se considera terminado el tratamiento. Se procedió a sembrar en placas con medio PCA, realizando un recuento cada 24 horas de las colonias bacterianas inoculadas a 30 °C. Se seleccionaron 48 colonias bacterianas y se repicaron hasta su estabilización (3 veces). Se realizaron pruebas enzimáticas de degradación en medios con PCA más leche descremada y se identificaron aquellos aislados bacterianos capaces de degradar caseína. Se procedió a determinar el índice de potencia enzimática proteolítica de los aislados bacterianos identificados anteriormente Se realizó tinción Gram en 51 clones bacterianos y se aislaron ocho clones representativos de las lagunas artificiales muestreadas. Se emplearon pruebas bioquímicas para la identificación de los ocho clones bacterianos aislados, los mismos que corresponden a los siguientes géneros: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Gardnerella*, *Plesiomonas* *Kurthia* y *Citrobacter* y *Moraxella* Como recomendación en la toma de muestras se debe procurar no afectar el sitio o zona de muestreo con el fin de que cada muestra sea representativa del lugar

1. INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los recursos que constituye la base para el desarrollo de la vida y el adelanto de los pueblos. Sin embargo uno de los graves problemas que aquejan al ambiente son las descargas de aguas residuales, en las corrientes y cuerpos superficiales de agua lo cual conduce al deterioro de la calidad de dichas aguas, hasta un grado tal que las puede inutilizar como fuente de abastecimiento para la comunidad, además de alterar y perturbar el equilibrio ecológico del ecosistema. .(Néstor, et al, 2011)

En las aguas residuales se depositan contaminantes como lácteos, proteínas, grasas, aceites, detergentes, pesticidas, entre otros. Muchas veces estas aguas residuales no son debidamente tratadas antes de ser vertidas a las diferentes cuencas hidrográficas y al ambiente en general, produciendo alteraciones que pueden provocar resistencia a estos contaminantes en los microorganismos presentes en los diferentes ecosistemas.

Los pantanos artificiales o humedales artificiales se pueden definir como sistemas de depuración en los que se reproducen los procesos de eliminación de contaminantes, que tienen lugar en las zonas húmedas naturales. La depuración de las aguas residuales tiene lugar al hacerlas circular a través de estas zonas húmedas artificiales, en las que tienen lugar procesos físicos, químicos y biológicos, que van reduciendo los contaminantes presentes, pero al presentarse un descuido de estos lugares, su eficiencia y remoción de los mismos decae más de un 60 %. (Perez et al, 2007)

Por cada mililitro de residuo orgánico mezclado con en las aguas residuales se albergan alrededor de 50. 000 millones de bacterias entre estas están las proteolíticas que tienen la capacidad de degradar proteínas mediante enzimas específicas (Arias I.2011) Estudios biotecnológicos que aprovechen este tipo de residuos hacen que se encuentren nuevas alternativas como aporte a la solución de problemas ambientales del que es objeto de este trabajo de titulación.

Por eso es importante publicar y dar a conocer los patrones, tendencias y nuevos estudios de actividad proteolítica en las bacterias existentes en los diferentes ambientes del país y el mundo para aplicar y ganar ventaja sobre ellas (Cornejo Juarez, 2007). Se plantea realizar un estudio bioprospectivo para determinar la presencia de microorganismos que se encuentra en los pantanos artificiales de shushufindi para dar respuesta y aportar a la comunidad información relevante:

¿Pueden las bacterias de los pantanos artificiales para tratamiento de aguas residuales tener actividades proteolíticas?

2. JUSTIFICACIÓN. OBJETIVOS

El agua es un recurso limitado y renovable. Renovable porque la cantidad de agua que se encuentra circulando continuamente por el ciclo hidrológico es constante, y limitado porque su disponibilidad en forma de agua dulce y líquida no está distribuida equitativamente por todo el globo. (Orozco et al., 2005). Al mismo tiempo, es el único líquido conocido por el ser humano que puede servir para la vida, desde el crecimiento de las plantas hasta para el consumo humano, teniendo una gran cantidad de utilidades.

Las bacterias y otros microorganismos pueden crecer en los ambientes diversos. Su capacidad y eficiencia metabólica permitieron que ellos colonizaran la superficie terrestre, el aire, el agua y prácticamente todas las regiones geográficas del planeta, especialmente el agua que albergar diferentes tipos de vida.

Siendo las aguas residuales las mayores fuentes de microorganismos, por lo que la búsqueda de bacterias con diferentes capacidades y más que todo con actividades enzimáticas como las proteolíticas es de interés científico a nivel mundial, pero se estima que menos del 1% de los microorganismos que habitan en el planeta han sido estudiados, y pudiera haber alrededor de 50 millones de especies bacterianas por descubrir. (Oliart et al., 2016: p. 82),

A su vez el enfoque actual de las nuevas investigaciones, en concordancia con la evolución de los procesos productivos a nivel industrial, está en la producción y purificación de enzimas, con el fin de reducir costos y optimizar los procesos industriales, generando nuevas tecnologías por ejemplo en el área de las biotransformaciones aplicables a nivel industrial y biotecnológico. (Lopez y Soria, 2018, p:2)

La estrategia ha sido continuar la búsqueda de nuevos microorganismos que presenten actividades enzimáticas interesantes, como las proteolíticas, y que estas mismas enzimas mediante su purificación ayuden a tratamientos de aguas residuales con diferentes contaminantes.

Las enzimas proteolíticas o proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, estas enzimas rompen un mismo tipo de enlace, el enlace amida o peptídico. Las proteasas se han convertido en las principales enzimas industriales, y constituyen más del 65% del mercado mundial de enzimas. Estas enzimas son ampliamente empleadas en la industria alimenticia, farmacéutica, textil, del cuero y para tratamiento de aguas residuales (Haki & Rakshit, 2003 citado en Rubiano, 2006: pp. 25-26).

Se han dirigido las investigaciones hacia las proteasas de microorganismos, utilizadas como aditivos en detergentes, además de sus aplicaciones en la industria del cuero para el tratamiento pieles, reemplazando el uso de químicos tóxicos y la descomposición de contaminantes en aguas residuales, esto hace que estas enzimas ocupen las principales posiciones con respecto a las aplicaciones

comerciales (Granados et al., 2003 citado en Rubiano, 2006: pp. 25-26).

Las proteasas son usadas en la industria alimenticia, para la fabricación de galletas, pan, etc., en la industria cervecera y en la industria de detergentes, mejorando la eficacia del lavado hidrolizando las proteínas coaguladas que no son dispersadas por el agua (Granados et al., 2003 citado en Rubiano, 2006: pp. 25-26).

Una forma de aplicación industrial de las proteasas sería sobre fibras proteínicas tales como plumas, cabello y uñas, las cuales, están abundantemente disponibles en la naturaleza como residuos. Estas pueden ser convertidas a biomasa útil, entre otros, proteínas concentradas o aminoácidos usando proteasas obtenidas a partir de ciertos microorganismos (Anwar & Saleemuddin, 1998 citado en Rubiano, 2006: pp.25- 26).

El conocimiento de proteasas de especies acuáticas es útil en acuicultura para el entendimiento de la fisiología, bioquímica y alimentación del organismo. En condiciones in vivo, la capacidad de los peces para digerir proteína, así como su absorción o asimilación, depende de la presencia y la calidad de las enzimas proteolíticas (González-Zamorano, Navarrete, & GarcíaCarreño, 2013).

Cabe destacar que en la actualidad también se está usando enzimas purificadas para tratamiento de aguas residuales y la descomposición de sus contaminantes, como parte de los tratamientos biológicos que estas reciben. (Durán, 2010 citado en Pazmiño Flores, 2016: pp. 9-11).

Una de las características importantes que presentan los lagos y lagunas contaminados es la elevación del pH del agua (Aguilar-Ibarra, 2010) Debido a esto, se plantea el estudio de microorganismos provenientes de los pantanos artificiales de Shushufindi buscando actividad proteolítica cuyas enzimas son de gran valor industrial, al presentar ventajas asociadas a su mayor estabilidad por ejemplo, pH extremos y agentes desnaturalizantes, lo que permitiría una mayor eficiencia en los procesos industriales.

Las proteasas presentan un gran potencial de aplicación biotecnológica en la industria y como una alternativa al tratamiento de aguas residuales.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar prospectivamente la actividad proteolítica en las bacterias de los pantanos artificiales de aguas residuales, Shushifindi.

Como objetivos secundarios se plantean:

- Caracterizar físico y químicamente el agua de los pantanos artificiales.
- Aislar las colonias bacterianas de las aguas provenientes de los pantanos artificiales.
- Realizar pruebas de actividad proteolítica e identificar las colonias bacterianas mediante pruebas bioquímicas.

3. METODOLOGÍA

3.1. Zona de estudio

Pantanos Artificiales de Shushufindi

La zona correspondiente al estudio (figura 1 y 2)

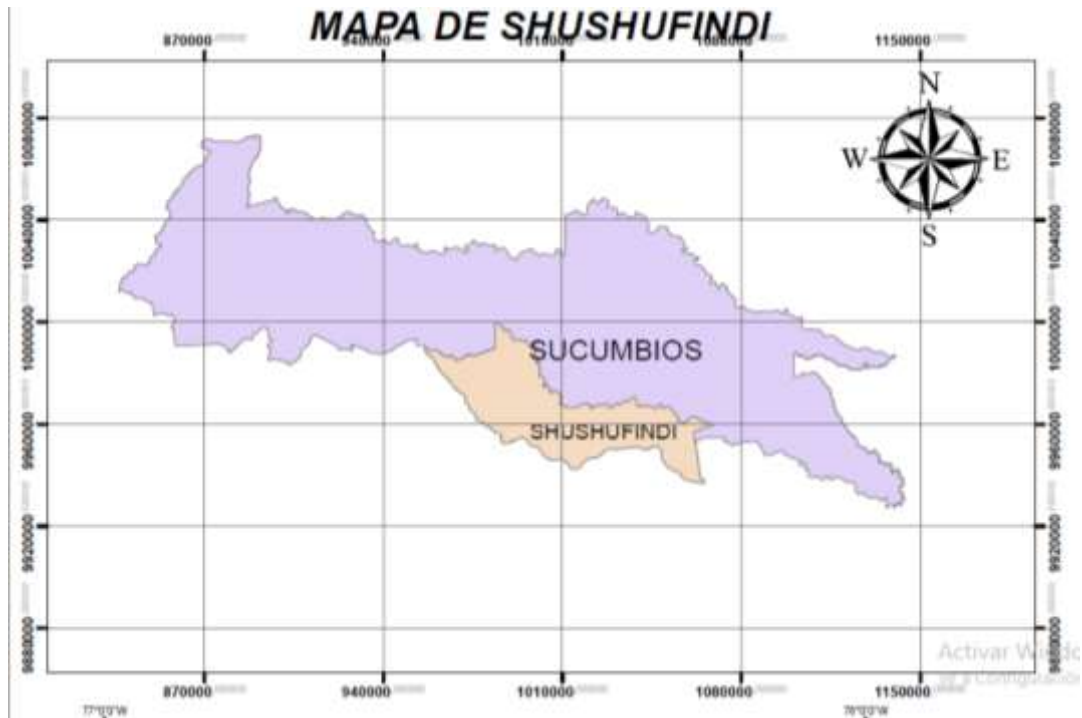


Figura 1 Mapa político de sucumbios

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

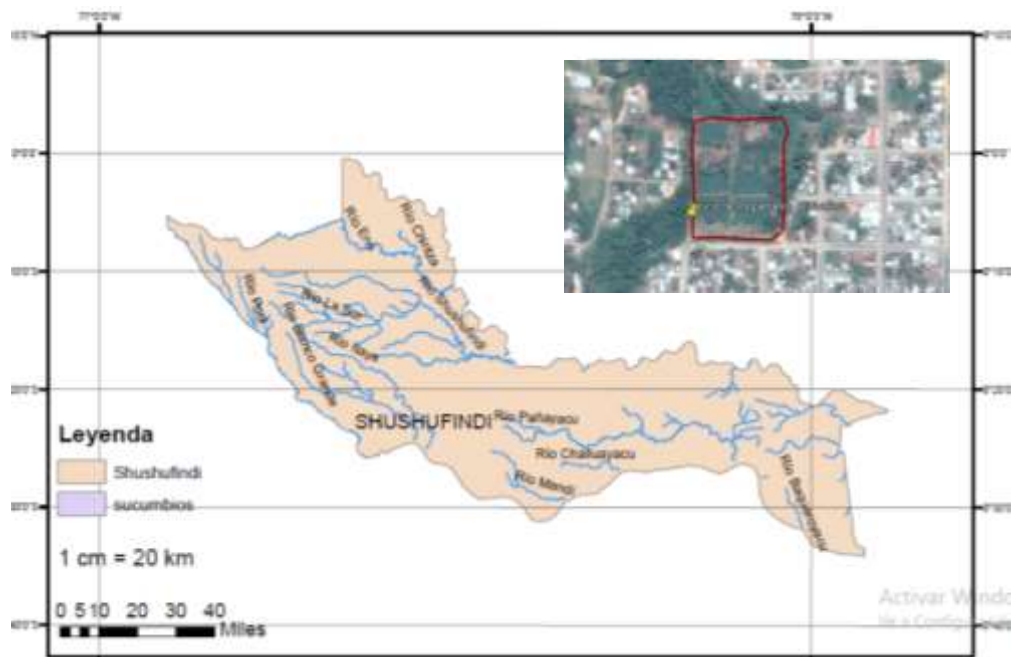


Figura 2 Ubicación de los ríos de shushufindi

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

El sitio de colecta de las aguas residuales se encuentra ubicado en la parroquia de San Francisco perteneciente a Shushufindi, provincia Sucumbíos. (GAD Sucumbíos, 2018)

Las aguas residuales fueron tomadas de los pantanos artificiales que sirven como tratamiento biológico de las mismas, se ubican a una latitud de $0^{\circ}10'53.88''S$ y una longitud de $76^{\circ}38'54.29''O$. Brinda solución a aproximadamente 400 usuarios, entre los habitantes del centro poblado y dos campamentos ubicados en este sector. Donde anteriormente contaban con un sistema de biodigestores nada funcional, por lo que cada morador trataba las aguas servidas de forma individual con acequias en sus terrenos, sin embargo, sobrepasada su capacidad, generaban problemas de insalubridad en el lugar. (GAD Sucumbíos, 2018)

El sistema de tratamiento de aguas residuales cuenta con 8 lagunas artificiales donde se decidió tomar 3 muestras por cada laguna, para dar seguimiento al proceso biológico.

3.2. Tipo y diseño de la investigación

El tipo de investigación es experimental y prospectiva.

Experimental, porque actuamos constantemente sobre el objeto de estudio de nuestra investigación, lo cual corresponde a las bacterias de las aguas residuales de los pantanos artificiales y su respectiva actividad enzimática

3.3. Obtención de la muestra

El criterio de muestreo de cada laguna artificial se basó en tomar 3 diferentes muestras representativas de puntos de interés con el fin de tener una apreciación real de la microbiota del área como se muestra a continuación:



Figura 3 Primer pantano Artificial

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

De todos los pantanos artificiales se obtuvo tres muestras, recolectando la primera del lugar de captación del agua, la segunda del lugar más cercano a los aireadores y la tercera muestra del punto de conexión con la siguiente laguna.

3.4. Técnicas de recolección de datos.

3.4.1. Toma de muestras

Para la toma de muestras se utilizaron frascos de plástico con tapa, limpios y estériles, se procedió a enjuagar el frasco por lo menos tres veces con el agua de la fuente, tomando la muestra en contra corriente con el fin de evitar contaminación. A continuación, se procedió a tapar inmediatamente los frascos y a sellar con parafilm para evitar fugas. Cada muestra fue identificada según el pantano artificial muestreado.

3.4.2. Caracterización física de las muestras de agua

La caracterización física y química se realizó ex situ en el laboratorio de la última laguna artificial correspondiente a aquella donde se considera terminado el tratamiento, antes de ser vertido al río más cercano de las lagunas artificiales. Se analizaron los siguientes parámetros de acuerdo a la normativa vigente:

Tabla 1 Parámetros de caracterización física de las muestras de agua

Parámetros	Unidad
T	°C
pH	
Conductividad eléctrica	us/cm
Sólidos Totales Disueltos	mg/l
Turbiedad	NTU
Hierro	mg/l
Aluminio	mg/l
Manganeso	mg/l
Sulfatos	mg/l
Cianuro	mg/l

3.4.3. Diseño de las unidades experimentales para las pruebas de degradación de caseína con bacterias de las aguas residuales de los pantanos artificiales Shushufindi.

Preparación de los medios de cultivo utilizados.

- Medio PCA.

Este medio de cultivo está conformado por triptona 5 g/l, dextrosa 1 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l y agar 12 g/L. para su preparación se siguió las instrucciones de la etiqueta comercial Mast Group Ltd.

- Medio leche descremada (LD).

En un matraz erlenmeyer se disolvieron 20 g/L de leche descremada en $\frac{1}{4}$ del volumen total a preparar, se esterilizó a 121 °C. En otro matraz se preparó 16 g/L de agar PCA en los $\frac{3}{4}$ de volumen restante, se calentó hasta ebullición durante un minuto y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. En condiciones asépticas se mezcló la leche descremada con el agar PCA y se vació en las cajas petri estériles (Ramírez y Luna., 1996).

Aislamiento, selección y recuento de las colonias bacterianas

Mediante el método de siembra en superficie utilizando un haza de vidrio se procedió a sembrar tres réplicas de cada punto de muestreo diluidas a 10^{-4} , en tres volúmenes diferentes de 25, 50 y 100 μ l, en cajas Petri con medio agar PCA. Se incubó a 30 °C. se procedió a realizar un recuento bacteriano durante 3 días cada 24 horas.

Se seleccionaron al azar 48 representantes de cada una de las diferentes colonias bacterianas que crecieron en las placas Petri, por cada fuente correspondiente a las lagunas artificiales.

Las 48 colonias bacterianas seleccionadas por cada fuente laguna artificial fueron sembradas con el uso de una plantilla, por el método de picadura en el medio e incubado a 30 °C (Herrera, 2003; Alane 1996),

A fin de estabilizar las colonias bacterianas, estas fueron replicadas luego de 24 horas de crecimiento en el mismo medio. Contando con al menos tres repiques.

3.4.4. Determinación de la actividad proteolítica

Inoculación de las cepas bacterianas.

Se inocularon las respectivas cepas por cada laguna artificial mediante la técnica de sembrado por picadura en placas Petri en el medio leche descremada (LD) a 30 °C.

Medición del índice de potencia de actividad enzimática

Se identificó aquellos clones bacterianos que presentaron halos de hidrólisis en el medio utilizado (LD)

Se realizaron 3 réplicas con los clones identificados por cada laguna artificial, que presentaron crecimiento bacteriano, se procedió a incubar a una temperatura de 30 °C. A las 24 horas de crecimiento, se registró el halo de hidrólisis.

Aislamiento por agotamiento de las bacterias.

Se seleccionó un clon bacteriano por cada laguna artificial. Como criterios para la selección de cada clon se tuvo en consideración su color y la presencia de un mayor halo de hidrólisis proteolítico.

Caracterización microscópica y macroscópica de los aislados bacterianos

- Microscópica

Se realizó una Tinción Gram de 51 clones bacterianos, los cuales mostraron un halo de hidrólisis y de 10 clones bacterianos que no mostraron halo de hidrólisis. Se procedió con la observación al microscopio con el fin de identificar forma y la clase bacteriana, Gram+ o Gram- (Tortora, Funke & Case, 200: pp. 55-74).

- Macroscópica

En la identificación macroscópica se tomó en consideración color y tamaño, de los 8 clones bacterianos aislados por agotamiento (Tortora, Funke & Case, 200: pp. 55-74).

Pruebas bioquímicas.

A cada clon bacteriano aislado, se le realizaron cinco pruebas bioquímicas las cuales fueron:

- Catalasa
- Medio SIM

- Prueba de la urea
- Medio con manitol salado
- Medio TSI

3.4.5. Análisis estadístico

Sistema de variables.

- Hipótesis

En bacterias de las lagunas artificiales de Shushufindi es posible encontrar proteasas

- Variables

Variable dependiente: Presencia de proteasas.

Variable independiente: Estado fisiológico de la colonia bacteriana.

Variable interviniente: Características físicas del agua.

.Índice de potencia (IP)

Se valoró la actividad proteolítica de acuerdo al índice de potencia (IP). El IP es la relación entre el diámetro del halo de hidrólisis y el diámetro de la colonia (Herrera, 2003; Alane, 1996).

Ecuación 1. Índice de Potencia (IP)

$$IP = \frac{\text{Diametro del Halo de Hidrolisis}}{\text{Diametro de la Colonia}}$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización física de las muestras de agua.

A continuación, se muestran los resultados de los parámetros físicos- químicos de las muestras de la última laguna artificial, la cual corresponde a aquella donde se considera terminado el tratamiento antes de ser vertido al río más cercano

Tabla 2 Resultados de la caracterización física de las muestras de agua.

Parámetros	Unidad	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	PROMEDIO	Valor máx permisible
T	°C	24.8	24.5	24.7	24,7	< 35
pH		7.2	7.0	7.5	7,2	7
Conductividad eléctrica	us/cm	920	950	900	923,3	
Sólidos Totales Disueltos (STD)	mg/l	4,5	4,3	4,5	4,4	1,0
Turbiedad	NTU	27.3	28.0	27.0	27,4	
Hierro	mg/l	4,1	4,2	4,0	4,10	10,0
Aluminio	mg/l	4,9	5,0	4,7	4,8	5,0
Manganeso	mg/l	7,0	7,1	7,3	7,1	2,0
Sulfatos	mg/l	7,4	7,6	7,8	7,6	0,5
Cianuro	mg/l	0	0	0	0,0	0,007

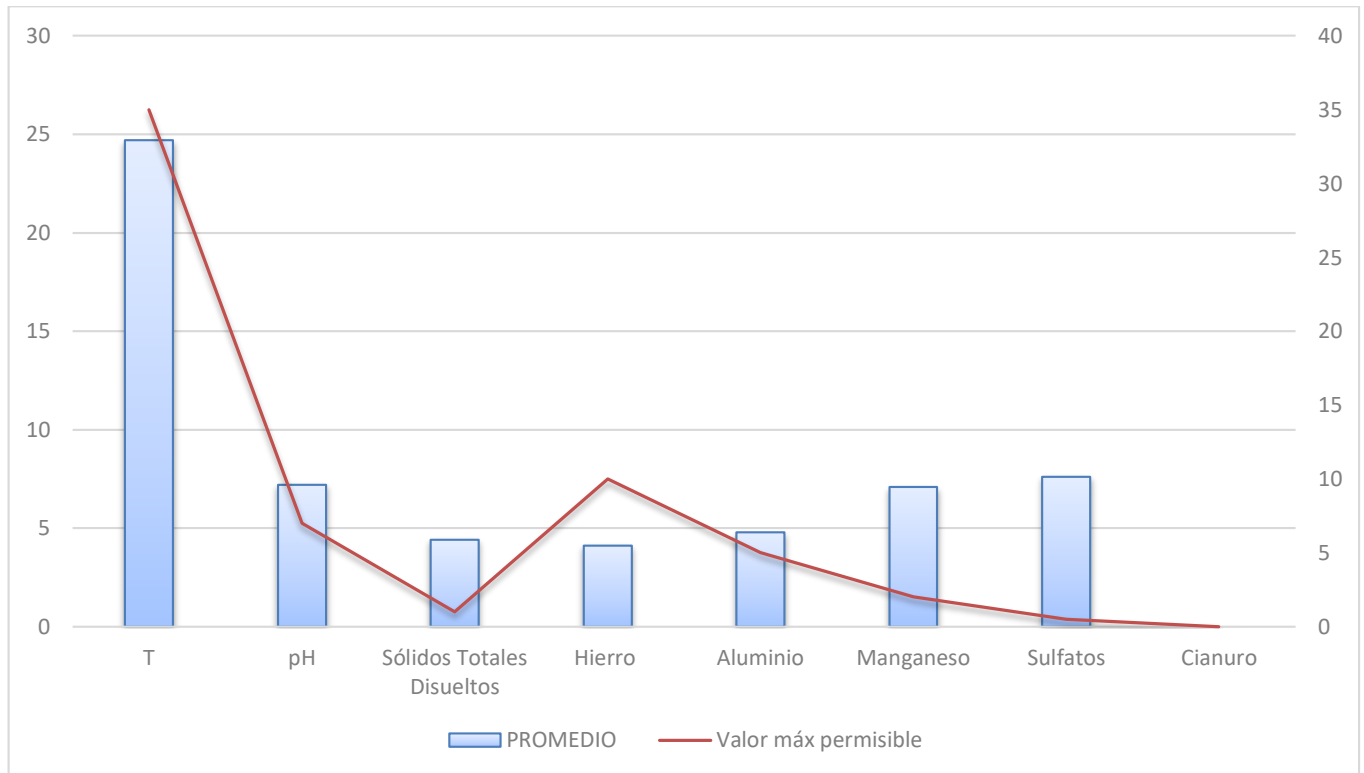
Realizado por: Soria, Liliana, 2019

Se analizó sólo la última laguna artificial con el fin de caracterizar los resultados del proceso de tratamiento de agua residual, antes de ser vertidos al afluente más cercano.

La caracterización del agua muestreada indicó respecto a los parámetros físicos un promedio de T de 24,7 °C, un pH de 7.2, CE de 923.3 us/cm; STD 4.4 mg/l y turbiedad de 27.4 NTU; mientras que en los parámetros químicos obtuvo un promedio de hierro igual a 4.10 mg/l, aluminio 4.8 mg/l, manganeso 7.1 mg/l; sulfatos 7.6 mg/l y nulo en cianuros.

Los valores obtenidos en los parámetros físicos son muy cercanos a los reportados por (Villaramin Robert, 2015) de T de 25 °C, un pH de 7.6, STD 3.5 mg/l y turbiedad de 26 NTU, en su estudio realizado sobre las aguas residuales de la misma ciudad. Y de la misma forma los parámetros químicos son cercanos a los reportados por (Berrones Deysi, 2013) con hierro 5 mg/l, aluminio 3 mg/l, manganeso 8 mg/l; sulfatos 10 mg/l y en su estudio realizado de aguas residuales en la ciudad del Coca

Gráfico 1 Comparación del promedio de los parámetros físicos y químicos de las muestras tomadas con respecto a la normativa vigente



Realizado por: Soria, Liliana, 2019

La gráfica 1 representa una comparación del promedio obtenido en los diferentes parámetros tanto físicos como químicos de la última laguna artificial con el fin de dar tratamiento de aguas residuales con respecto a la norma técnica para el control de descargas líquidas, donde se indica que los parámetros como el pH, sólidos totales disueltos, aluminio, manganeso y sulfatos se encuentran por encima del valor máximo permisible para descargas, y que único parámetro que cumple con la norma es el hierro encontrándose cercano al valor máximo.

Los valores a considerar con mayor preocupación son los correspondientes a sulfatos y manganeso, los mismos que respecto a la norma técnica para el control de descargas líquidas, son los más elevados, lo que no sucede con el cianuro o el hierro cumplen con los límites máximos permisibles.

Al verter el agua con estas condiciones físicas y químicas directamente a afluente, indica que se está produciendo una contaminación de las mismas. Estos resultados también se evidencian en el estudio para el diseño de un sistema de tratamiento de aguas residuales en la parroquia Sibambe, realizado por (Berrones Deysi, 2013), por lo que en este estudio se intenta implementar un sistema de tratamientos a las aguas, dándonos a pensar que en las lagunas artificiales el tratamiento que se da, está actuando de forma deficiente, no cumpliendo las necesidades de la ciudad donde se encuentra.

4.2. Recuento de las colonias bacterianas.

Tabla 3 Recuento de las colonias bacterianas UFC/ul

Lagu na	Tiempo (h)	Muestra 1			Muestra 2			Muestra 3		
		UFC/25 uL	UFC/50 uL	UFC/10 0 uL	UFC/25 uL	UFC/50 uL	UFC/10 0 uL	UFC/25 uL	UFC/50 uL	UFC/10 0 uL
1	24	5	10	20	3	5	10	0	3	3
	48	7	10	21	3	5	10	2	4	10
	72	9	12	25	5	7	10	2	4	12
2	24	10	21	30	10	15	20	11	11	23
	48	10	21	30	10	15	20	11	12	23
	72	10	22	30	10	17	25	11	12	26
3	24	30	40	53	21	30	48	11	11	21
	48	34	40	55	22	30	49	11	12	23
	72	35	40	57	22	30	49	11	14	26
4	24	100	173	220	40	120	150	2	3	3
	48	100	175	210	42	120	150	2	3	3
	72	109	180	238	42	120	150	2	4	5
5	24	45	130	150	45	93	120	5	7	10
	48	47	137	150	45	93	125	5	7	10
	72	50	137	150	45	95	125	6	10	10
6	24	65	162	200	60	150	188	64	159	201
	48	65	162	200	60	150	188	64	159	201
	72	65	162	200	60	150	188	64	159	201
7	24	12	20	49	10	40	74	2	3	3
	48	12	22	49	11	45	90	2	3	3
	72	12	26	49	11	47	91	2	4	5
8	24	6	30	50	5	18	60	3	5	11
	48	9	39	79	9	22	62	3	8	20
	72	14	43	109	15	50	89	4	11	35

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

En la muestra 1 el mayor recuento bacteriano fue de la laguna artificial 4 correspondiendo a 238 UFC a una concentración de 100 μ L, 180 UFC a una concentración de 50 μ L y 109 UFC a una concentración de 25 μ L, esta muestra fue recolectada en la conexión entre la tercera laguna y cuarta, esta agua corresponde a la tratada previamente en la laguna tres, el día de la colecta esta laguna se encontraba a

rebosar por lo que se puede relacionar a contaminantes externos debido a la cantidad de agua existente en ella.

En la muestra 2 el mayor recuento bacteriano fue de la laguna 6 correspondiendo a 188 UFC a una concentración de 100 µL, 150 UFC a una concentración de 50 µL y 60 UFC a una concentración de 25 µL, la muestra de esta laguna fue recolectada en una zona con la presencia de varios insectos, además cercana a un sistema de aireación por lo que el mayor crecimiento de las bacterias registrado, puede atribuirse a la contaminación del agua debida a tales insectos.

El mayor recuento bacteriano en la muestra 3 fue de la laguna 6 correspondiendo a 201 UFC a una concentración de 100 µL, 159 UFC a una concentración de 50 µL y 64 UFC a una concentración de 25 µL, esta muestra de tal laguna corresponde a una zona de conexión entre la laguna 6 y la laguna 7 de igual forma esta laguna se encontraba a rebosar lo que puede indicar contaminantes externos.

El menor recuento bacteriano en general de todas las muestras y concentraciones fue en la fuente 4 y 7 en las cuales hubo 5 UFC, a 100 µL Esta fuente se encuentra poca cantidad de agua, a un 50% de su capacidad, por lo que se presume que no es intervenida por contaminantes externos y que en estas se está produciendo una tratamiento de aguas residuales de forma correcta.

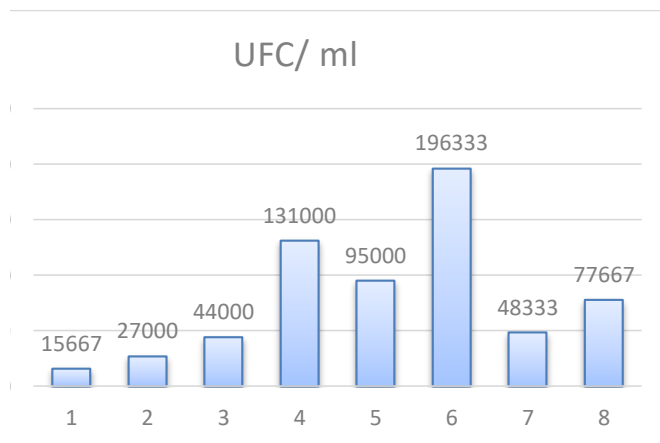
El mayor recuento bacteriano se registró en la muestra 1 de la laguna 4, a una concentración de 100 µL, siendo este el valor de 238 UFC, la cual difiere a lo reportado por (Berrones Deysi, 2013) de 53.3×10^6 UFC en promedio de las aguas residuales de su estudio, por lo que se presume que la variación en el recuento bacteriano se debe a una diferencia en la dilución realizada, las condiciones climáticas y la técnica de recolección de muestras.

Tabla 4 Promedio del recuento bacteriano a las 72 h en UFC/ ml

Laguna	UFC/ ml
1	15667
2	27000
3	44000
4	131000
5	95000
6	196333
7	48333
8	77667

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

Gráfico 2 Unidades formadoras de colonia por mililitro vs laguna artificial muestreada



Realizado por: Soria, Liliana, 2019

En promedio de las tres muestras tomadas por cada laguna artificial el mayor recuento bacteriano a las 72 horas corresponde a 196333 UFC/ mL de la laguna 6 y el menor recuento bacteriano es de 15667 UFC/mL de la laguna 1. Los resultados presentados puede deberse a contaminación externa debido a que algunas lagunas se encontraban rebozando.

4.3. Pruebas de degradación de caseína con las bacterias de las lagunas artificiales Shushufindi

Con las pruebas de degradación realizadas en el medio Leche descremada en mezcla de PCA se logró la observación de halos de hidrólisis de los aislados bacterianos por lo que se procedió a utilizar tal medio para la determinación del IP de cada aislado bacteriano.

4.4. Determinación del índice de potencia de actividad enzimática

Tabla 5 Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 1

Aislado	Promedio IP
1	2,8
2	3,2
3	3,1
4	2,7
5	1,0
6	1,4
7	1,0
8	1,1
9	2,9
10	1,4
11	3,0
12	2,0
13	2,5
14	2,3

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

Tabla 6 Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 2

Aislado	Promedio IP
15	2,6
16	2,6
17	2,4
18	2,7
19	2,8
20	2,5
21	1,3
22	1,2
23	1,0
24	2,8
25	1,0
26	2,6
27	2,4
28	1,7
29	2,0

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

Tabla 7 Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 3

Aislado	Promedio IP
30	3,2
31	1,7
32	1,9
33	1,9
34	2,1
35	1,0
36	2,1
37	3,0
38	1,2
39	2,3
40	2,3

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

Tabla 8 Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 4

Aislado	Promedio IP
41	1,7
42	1,8
43	1,4
44	1,0
45	2,9
46	2,6
47	2,9
48	3,0
49	2,0
50	1,4
51	2,7
52	2,6
53	2,6
54	2,7
55	2,8

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

Tabla 9 Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 5

Aislado	Promedio IP
56	2,4
57	3,0
58	2,8
59	3,1
60	2,6
61	2,6
62	2,2
63	2,2
64	2,5
65	2,2
66	2,0
67	2,6
68	2,3
69	2,4
70	2,7

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

Tabla 10 Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 6

Aislado	Promedio IP
71	1,7
72	1,6
73	3,9
74	1,0
75	2,4
76	3,0
77	2,9
78	1,0
79	2,6
80	2,5
81	2,5
82	2,3

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

Tabla 11 Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 7

Aislado	Promedio IP
83	1,2
84	3,0
85	1,6
86	2,5
87	3,3
88	3,2
89	2,3
90	2,3
91	1,4
92	2,3
93	2,9
94	2,6
95	2,8
96	1,4
97	2,6

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

Tabla 12 Promedio de la determinación del índice de potencia de actividad proteolítica (IPP) mostrado por los aislados bacterianos en la laguna artificial 8

Aislado	Promedio IP
98	1,5
99	1,9
100	1,5
101	2,3
102	1,8
103	1,7
104	1,5
105	1,0
106	1,5
107	1,7
108	1,8
109	1,6
110	1,7
111	2,6
112	1,5

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

El mayor índice de potencia registrado en la fuente 1 pertenece al aislado bacteriano 2 con un valor de 3.2, a su vez en la laguna artificial 2 el aislado bacteriano 19 exhibe un valor de IP máximo de 2.8, en la laguna 3 el aislado con el máximo IP es el 30 con un valor de 3.2, el aislado 48 de la laguna 4 tiene el valor de IP mayor de 3.0, en la laguna 5 el mayor IP fue de 3.1 correspondiente al aislado bacteriano 59, el 73 perteneciente a la laguna 6 con un IP de 3.9, en la laguna 7 el mayor IP fue de 3.3 presentado por el aislado bacteriano 87 y por último, en la laguna 8 el mayor IP observado es de 2.6 registrado en el aislado bacteriano 111.

Comparando la actividad proteolítica en las diferentes lagunas artificiales se concluye que el mayor IP registrado pertenece al aislado bacteriano 73 de la fuente 6 ya que posee un valor de IP de 3.9.

Pascual Domínguez (2014: p. 48), obtiene un IP de 1,9 a las 48 horas de crecimiento y 32 °C para la cepa *Bacillus licheniformis*, este valor es menor a los reportados en este trabajo de investigación para las evaluaciones con el medio leche descremada a 24 horas y 30 °C, ya que el mayor índice de potencia obtenido fue de 3,9 del aislado bacteriano 73, perteneciente a la laguna 6, siendo este valor el doble del reportado por Pascual Domínguez.

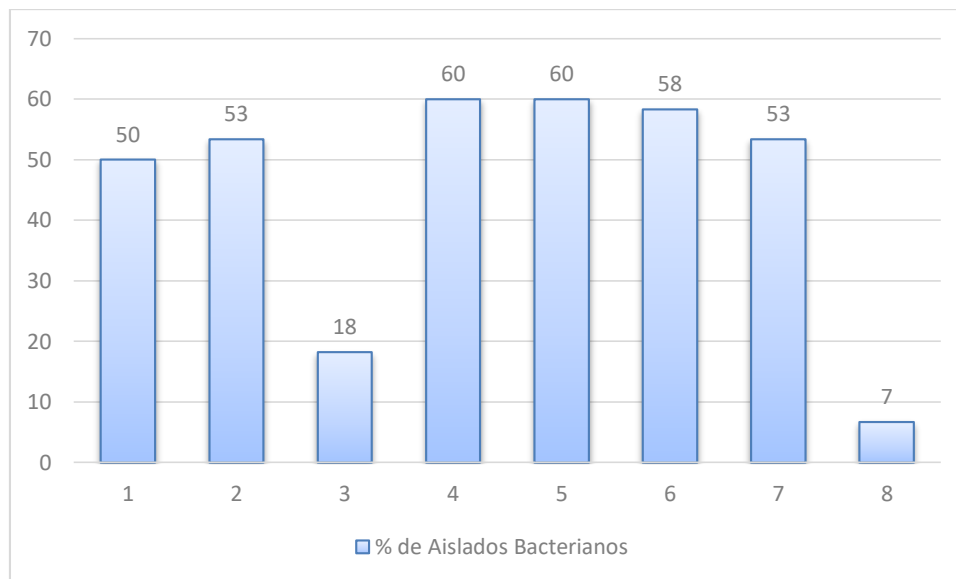
Mientras que en un estudio de la actividad proteolítica desarrollado por (Soria y Lopez, 2018) obtienen un IP proteolítico de 3.86 a 35 °C, en la cepa de *Plesiomonas* resultado que es similar al presentado en este trabajo investigativo.

Tabla 13 : Porcentaje de aislados bacterianos que mostraron un IPP mayor o igual a 2,50 por laguna artificial de aguas residuales con tratamiento LD.

Laguna Artificial	Total de Aislados Bacterianas	Número de Aislados Bacterianas con IPP \geq 2,50	% de Aislados Bacterianos
1	14	7	50
2	15	8	53
3	11	2	18
4	15	9	60
5	15	9	60
6	12	15	125
7	15	8	53
8	15	1	7

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

Gráfico 3 Porcentaje de aislados bacterianos que mostraron un IPP mayor o igual a 2,50 vs Laguna Artificial.



Realizado por: Soria, Liliana, 2019

La mayoría de las lagunas artificiales presentan un porcentaje similar por encima del 50 % de Aislados Bacterianas que poseen un índice de potencia proteolítica mayor o igual a 2,50. Las lagunas 4 y 5 son las más altas llegando a un 60%, mientras que se da a notar que en la última laguna correspondiente a la 8, de todos los aislados bacterianos crecidos, sólo se presenta un 7% con actividad proteolítica por encima de 2,5.

4.5. Evaluación microscópica de los aislados bacterianos

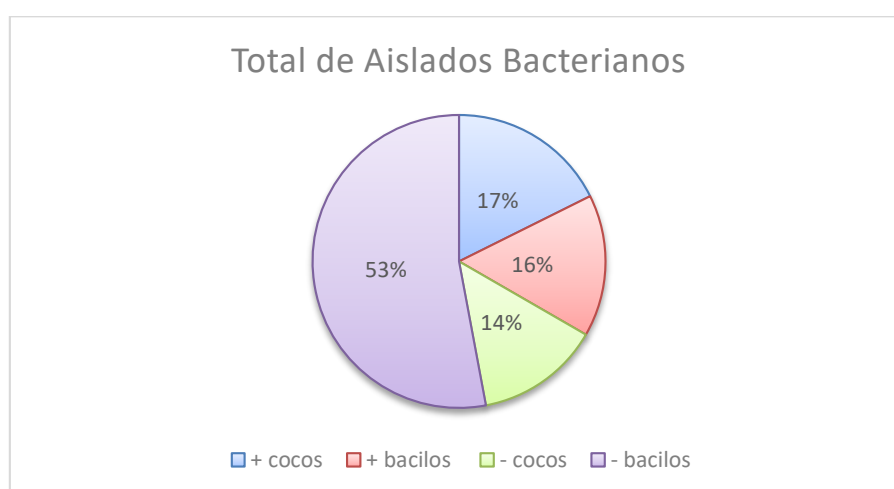
Tabla 14 Evaluación microscópica de los aislados bacterianos

Aislado Bacteriano	Gram	Forma
1	-	Cocos
2	-	Cocos
3	-	Bacilos
4	-	Cocos
9	-	Bacilos
11	-	Bacilos
13	+	Cocos
15	-	Bacilos
16	-	Bacilos
17	+	Cocos
18	-	Bacilos
19	-	Cocos
20	-	Bacilos
24	-	Bacilos
26	-	Cocos
30	-	Bacilos
37	-	Bacilos
45	-	Cocos
46	-	Cocos
47	-	Bacilos
48	+	Bacilos
51	-	Bacilos
52	-	Bacilos
53	-	Bacilos
54	-	Bacilos
55	-	Bacilos
56	+	Cocos
57	+	Bacilos
58	-	Bacilos
59	+	Bacilos
60	-	Bacilos
61	+	Cocos
64	+	Cocos
67	+	Bacilos
70	+	Bacilos
73	-	Bacilos
75	+	Cocos
76	+	Bacilos
77	+	Bacilos
79	-	Bacilos
80	+	Cocos
81	-	Bacilos

84	+	Cocos
86	-	Bacilos
87	-	Bacilos
88	-	Bacilos
93	-	Bacilos
94	-	Bacilos
95	-	Bacilos
97	+	Cocos
111	+	Bacilos

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

Gráfico 4 Porcentaje de aislados bacterianos según su forma y diferenciación entre Gram + y Gram -



Realizado por: Soria, Liliana, 2019

De los 51 aislados bacterianos seleccionados, el 53% fueron identificados como Bacilos Gram -, mientras que el 16% fueron Bacilos Gram +, seguido del 14% que fueron cocos Gram - y por último el 17% como cocos Gram +.

A diferencia Córdoba (2010: p. 60) y (Soria y Lopez, 2018) que reportan el 68% y 60% respectivamente fueron identificadas como Bacilos Gram -, mientras que el 12% y 16% fueron Bacilos Gram +, seguido del 20% y 13% que fueron cocos Gram + y por último el 0% y 11% como cocos Gram - en sus estudios, siendo estos porcentajes relativos a los presentados en este trabajo investigativo

4.6. Identificación macroscópica y pruebas bioquímicas

Tabla 15 Género de los clones bacterianos aislados

Clon Bacteriano Aislado	Género
2	<i>Micrococcus</i>
19	<i>Staphylococcus</i>
30	<i>Proteus</i>
48	<i>Gardnerella</i>
59	<i>Plesiomonas</i>
73	<i>Kurthia</i>
87	<i>Citrobacter</i>
111	<i>Moraxella</i>

Realizado por: Soria, Liliana, 2019

Sobre los ocho clones que mostraron mayor actividad enzimática proteolítica, se procedió a realizar su identificación mediante una serie de pruebas bioquímicas, las cuales permitieron una identificación presuntiva de los géneros microbianos aislados, comparándolos con la descripción estándar del Manual de Bergey sobre bacteriología determinativa (2000), Diagnostico Microbiológico de Koneman (2008.) y demás bibliografía. Los aislamientos se identificaron hasta el nivel de género; obteniendo como resultado bacterias de los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Gardnerella*, *Plesiomonas* *Kurthia* y *Citrobacter* y *Moraxella*.

El género *Micrococcus* registrado en este trabajo en la fuente 1, según estudios de Odu & Akujobi (2012: pp. 1-6) posee actividad proteolítica, así mismo Benavides Campaña (2017: p. 119) identifica a este género en las aguas residuales de la comunidad Cunuyacu ubicadas en la parroquia Pastocalle

El género *Proteus* encontrada en este trabajo en la laguna 3, según estudios de Gómez et al (2006: p. 47) y Dinorín (2012: p. 93) posee actividad proteolítica. A su vez en el trabajo de Naranjo & Pambabay (2015: p. 55) se menciona que este género habita en fuentes de agua, por lo que podemos decir que puede ser encontrada en este ambiente.

El género *Gardnerella* encontrado en este trabajo en la fuente 4, según estudios de Loza & Jiménez (2006: pp. 15-20) y Espinosa et al, (2005: pp. 3-6) posee actividad proteolítica, a su vez según Trujillo (2017: p. 16) este género es un patógeno en humanos lo que se presume que esa es el medio por el cual ha llegado a estas aguas residuales.

El género *Plesiomonas* registrado en este trabajo en la fuente 5, según estudios de Ponce et al, (2005: p. 2) posee actividad proteolítica, además en el estudio realizado por Rodríguez & Antillón (1989: pp. 1-5) se menciona que es un género propio del ambiente acuático..

Los géneros bacterianos registrados en el presente estudio, se asemejan a los reportados en anteriores investigaciones sobre actividad proteolítica con bacterias aisladas de efluentes contaminados; encontrando géneros bacterianos como *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Enterobacter*, a los cuales se los asocia con el desarrollo de mecanismos de resistentes a diferentes contaminantes. (Alam et al., 2011),

(Mullick, 2012.). Los géneros mencionados son constantes, al igual que el género *Kurthia*, en aislados a partir de pieles sin curtir, y pieles en diferentes etapas del proceso de elaboración del cuero, fundamentos que permiten respaldar los datos obtenidos (Lama, A., 2010). Dando a entender que por sus contaminantes, estas bacterias también presenten actividad proteolítica.

5. CONCLUSIONES

La evaluación física y química de las lagunas artificiales para tratamiento de aguas residuales de Shushufindi mostró una caracterización de parámetros físicos un promedio de O₂ de 415.7; T de 24, 7 °C, un pH de 7.2, CE de 923.3 us/cm; STD 4.4 mg/l y turbiedad de 27.4 NTU; mientras que en los parámetros químicos obtuvo un promedio de hierro igual a 4.10 mg/l, aluminio 4.8 mg/l, manganeso 7.1 mg/l; sulfatos 7.6 mg/l y nulo en cianuros, Sólo se analizó la fuente 8 debido a que en esta fuente se considera culminado el tratamiento de las aguas y posteriormente se vierten en el efluente más cercano. La mayoría de los parámetros analizados no cumplen con la normativa para fuentes de descargas a excepción de la cantidad de hierro que se encuentra próximo al límite máximo permisible.

Se aislaron 48 colonias bacterianas por laguna artificial, en total se obtuvieron un total de 384 aislados bacterianos los cuales se estabilizaron 3 veces en medio con PCA.

Se realizaron pruebas de degradación de caseína a los aislados bacterianos en tratamientos con medio PCA, evaluando que la mayor parte de aislados bacterianos presentaron halos de degradación en las pruebas de caseína con una actividad enzimática muy alta, siendo en un 50 % superior a 2,50.

El mayor índice de potencia en actividad Proteolítica corresponde al clon 73 con un valor de 3,9 con este valor de índice se puede concluir que las bacterias provenientes de las lagunas artificiales para aguas residuales en la ciudad de Shushufindi tienen una alta actividad enzimática por lo que se debería utilizar estos aislados en los diferentes procesos industriales no alimenticios a fin de ganar mayor beneficios a menor costo.

Se aislaron géneros bacterianos correspondientes a *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Gardnerella*, *Plesiomonas Kurthia* y *Citrobacter* y *Moraxella*.

6. BIBLIOGRAFÍA

Anwar, A.; & Saleemuddin, M. "Alkaline proteases: a review". *Revista Bioresource technology* [en línea], 1998 (Ámsterdam- Netherlands), 64 (3), pp. 175-183. [Consulta: 17 de Junio 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085249700182X>

Benavides Campaña, C. L. *Análisis microbiológico de las aguas residuales en la comunidad Cunuyacu ubicado en la parroquia Pastocalle perteneciente a la provincia de Cotopaxi* [en línea] (Tesis)(Maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador, 2017, p. 88. [Consulta: 17 de Junio 2019]. Disponible en: <http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/6932/1/56T00735.pdf>

Berrones Deysi. . *Diseño de un sistema de tratamiento de aguas residuales para la parroquia sibambe. Epoch.* [en línea] (Tesis)(Maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 2013, p 20. [Consulta: 17 junio 2019]. Disponible en <http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/3200/1/96T00234.pdf>

Dinorín Téllez Girón, Jabel. *Evaluación de la actividad de lipasas a partir de cultivos de microorganismos aislados de suelos y su aplicación en la transesterificación de aceites de desecho* [en línea] (Tesis)(Maestría). El Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación de Biotecnología Aplicada. Tepatitlán- México, 2012, p. 93. [Consulta: 04 abril 2019]. Disponible en: <http://repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/6935/1/TESIS%20JABEL%20DINORIN%20TELLEZ%20GIRON.pdf>

Gómez, Patricia; Cabrera, Roberto; Cravioto, Alejandro. "Haemophilus Influenzae B: Una revisión sobre los determinantes de patogenicidad y de la respuesta inmune a la infección". *Revista Salud Pública de México* [en línea], 1991 (Ciudad de México- México), 33(5), pp. 504-512. [Consulta: 04 abril 2019]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/106/10633508.pdf>

González Bacerio, Jorge; Rodríguez Hernández, Jairo; Monte Martínez, Alberto. "Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial". *Revista Colombiana de Biotecnología* [en línea], 2010 (Bogotá - Colombia), 12(1), pp. 124-140. [Consulta: 04 abril 2019]. Disponible en: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/artic le/view/15574/38075>

Granados, L., et al. *Evaluación de la actividad proteolítica y amilolítica de actinomicetes termófilos aislados a partir de pilas de compost* [en línea] (Tesis)(Maestría). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá- Colombia, 2003, pp. 25-26. [Consulta: 04 abril 2019]. Disponible en: <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis249.pdf>

Haki, G. D., & Rakshit, S. K. "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review". *Revista Bioresource technology* [en línea], 2003 (Ámsterdam- Netherlands), 89(1), pp. 17-34. [Consulta: 04 abril 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852403000336>

Loza Orozco, M. E., & Jiménez Marcos, G. (2006). *Incidencia de rotura prematura de membranas en gestantes con Gardnerella vaginalis diagnosticado mediante muestra de papanicolaou durante el control pre natal y efecto del tratamiento. Instituto Nacional Materno Perinatal* [en línea] (Tesis)(Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Lima- Perú, 2006, p. 15-20. [Consulta: 04 abril 2019]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1146/1/Jimenez_mg.pdf

Naranjo Pambabay, M. *Estudio microbiológico de las aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu, parroquia Pilahuin, provincia Tungurahua.* [en línea] (Tesis)(Maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba- Ecuador, 2015, p. 55. [Consulta: 05 abril 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4508/1/56T00572%20UDCTFC.pdf>

Odu N. "Protease production capabilities of Micrococcus luteus and Bacillus species isolated from abattoir environment", *Journal of Microbiology Research.* [en línea], 2012, (Abuya, Nigeria), 2(5), pp. 1-6. [Consulta: 05 abril 2019]. Disponible en: <http://article.sapub.org/10.5923.j.microbiology.20120205.03.html>

Oliart Ros, Manresa Presas Á. & Sánchez Otero M. "Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico.", *CienciaUAT*, ., [en línea], 2016, (Victoria, México), 11(1), pp. 79-90. [Consulta: 05 abril 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-78582016000200079&script=sci_arttext#B3

Pazmiño Flores Y. *Evaluación de la eficiencia de las bacterias lipolíticas de rumen de vaca para la degradación de aguas residuales con grasas y aceites.* [en línea] (Tesis)(Maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba- Ecuador, 2016, pp. 9-11. [Consulta: 05 abril 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/6254#sthash.x0Sqlz8Y.dpuf>

Pascual Dominguez M. *Aislamiento y purificación de metabolitos de (bacillus licheniformis y trichoderma harzianum) con potencial nematocida.* [en línea] (Tesis)(Maestría). Universidad autónoma agraria antonio narro, Saltillo – México, 2013, p. 48, [Consulta: 05 abril 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1538/AISLAMIENTO%20Y%20PURIFICACI%20DE%20METABOLITOS%20DE%20%28Bacillus%20licheniformis%20y%20Trichoderma%20harzianum%29%20CON%20POTENCIAL%20NEMATOCIDA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Perez et al. *Uso de Enzimas de Tipo Ureasa en el Tratamiento de. Información Tecnológica.* [en línea] (Tesis)(Maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de

Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 2007, p 20. [Consulta: 17 junio 2019]. Disponible en
Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v18n5/art06.pdf>

Ponce C., Armenteros A., Villoch C, Montesdeoca N, & Carreras J. “Evaluación de riesgos microbiológicos y químicos de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda.”, *Unidad de Análisis y Tendencias en Salud, La Habana*, [en línea], 2005, (La Habana - Cuba), p.2, [Consulta: 05 abril 2019]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/uats/rtv_files/2005/rtv0505.pdf

Rodríguez, & Antillón . “*Aeromonas spp.* y *Plesiomonas shigelloides* en bivalvos, cieno y aguas del Golfo de Nicoya, Costa Rica”. *Revista de biología tropical*. [en línea], 1989, (San José- Costa Rica), pp. 1-5, [Consulta: 05 abril 2019]. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/23618/23820>

Soria y Lopez. *Evaluación prospectiva de la actividad lipolítica y proteolítica en bacterias de las aguas termales de los ilinizas, provincia de cotopaxi*. [en línea] (Tesis)(Maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas . Riobamba-Ecuador 2018, p 20. [Consulta: 17 junio 2019]. Disponible en <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/10419/1/236T0389.pdf>

Trujillo García, M. *Biofilms microbianos*. [en línea] (Tesis)(Doctoral). Universidad de la laguna. San Cristóbal de La Laguna – España, 2017, p. 16. [Consulta: 05 abril 2019]. Disponible en: [https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5023/biofilms %20 microbianos.pdf?sequence=1](https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5023/biofilms%20microbianos.pdf?sequence=1)

Villaramin Robert. *Rediseño de la planta de tratamiento de aguas residuales utilizando humedales artificiales para la extractora de aceite de palma pexa del canton la concordia*. [en línea] (Tesis)(Maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 2015, p 20. [Consulta: 17 junio 2019]. Disponible en <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4797/1/236T0147.pdf>

ANEXOS

Anexo A: Lugar de muestreo

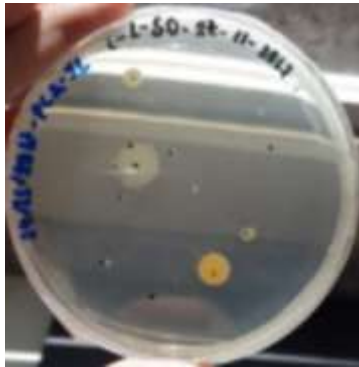


Lagunas artificiales de aguas residuales



desemboque de las lagunas artificiales

Anexo B: Recuento de las colonias bacterianas.



Recuento Bacteriano a 25 μL de la Muestra I de la Laguna artificial 1 en Agar PCA.



Recuento Bacteriano a 50 μL de la Muestra I de la Laguna artificial 1 en Agar PCA



Recuento Bacteriano a 100 μL de la Muestra I de la Laguna artificial 1 en Agar PCA.



Recuento Bacteriano a 25 μL de la Muestra II de la Laguna artificial 1 en Agar PCA.



Recuento Bacteriano a 50 μL de la Muestra II de la Laguna artificial 1 en Agar PCA.



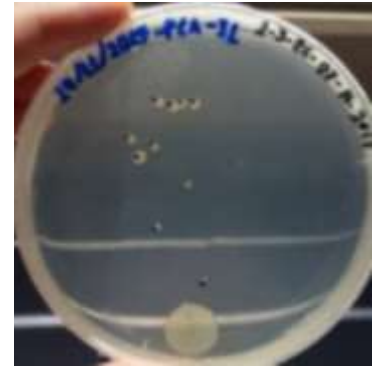
Recuento Bacteriano a 100 μL de la Muestra II de la Laguna artificial 1 en Agar PCA..



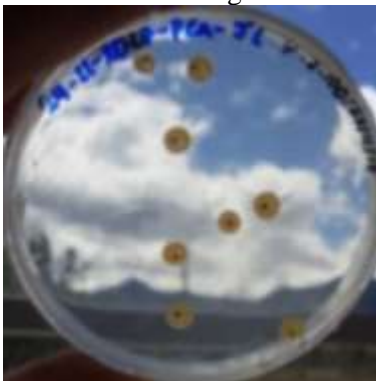
Recuento Bacteriano a 25 µL de la Muestra III de la Laguna artificial 1 en Agar PCA.



Recuento Bacteriano a 50 µL de la Muestra III de la Laguna artificial 1 en Agar PCA.



Recuento Bacteriano a 100 µL de la Muestra III de la Laguna artificial 1 en Agar PCA..



Recuento Bacteriano a 25 µL de la Muestra I de la Laguna artificial 2 en Agar PCA.



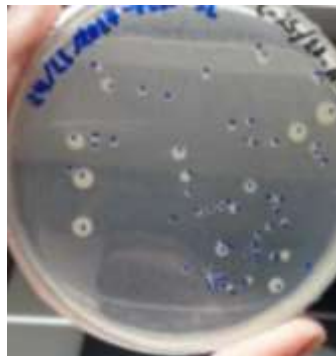
Recuento Bacteriano a 50 µL de la Muestra I de la Laguna artificial 2 en Agar PCA.



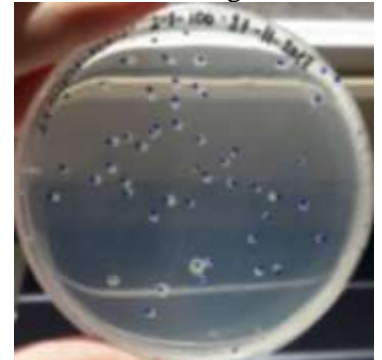
Recuento Bacteriano a 100 µL de la Muestra I de la Laguna artificial 2 en Agar PCA..



Recuento Bacteriano a 25 µL de la Muestra II de la Laguna artificial 3 en Agar PCA.



Recuento Bacteriano a 50 µL de la Muestra II de la Laguna artificial 3 en Agar PCA.



Recuento Bacteriano a 100 µL de la Muestra II de la Laguna artificial 3 en Agar PCA..



Recuento Bacteriano a 25 µL de la Muestra III de la Laguna artificial 4 en Agar PCA.



Recuento Bacteriano a 50 µL de la Muestra III de la Laguna artificial 4 en Agar PCA.

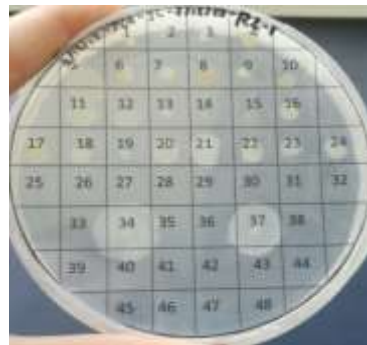


Recuento Bacteriano a 100 µL de la Muestra III de la Laguna artificial 4 en Agar PCA..

Anexo C: Estabilización de los aislados bacterianos.



Primera réplica de la fuente 1.



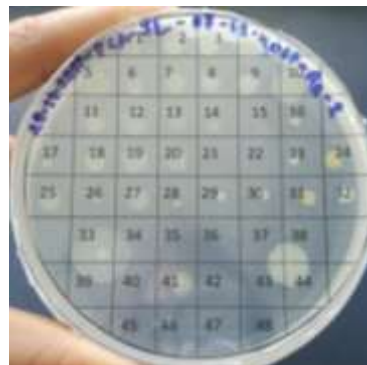
Segunda réplica de la fuente 1



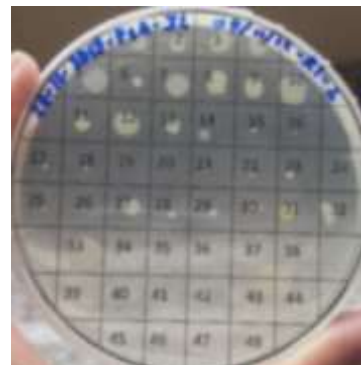
Tercera réplica de la fuente 1.



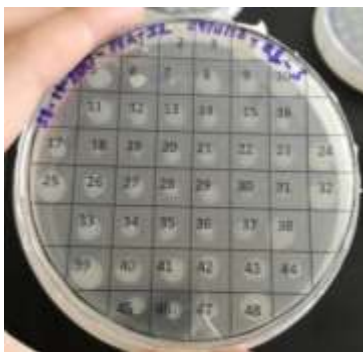
Primera réplica de la fuente 2



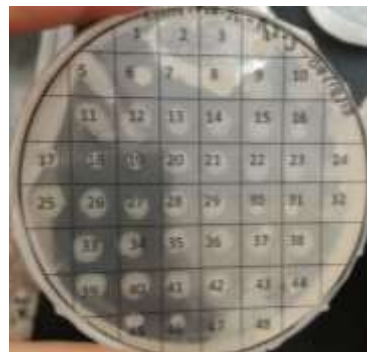
Segunda réplica de la fuente 2



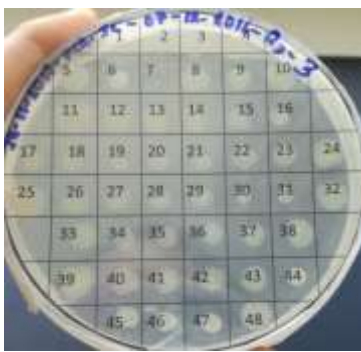
Tercera réplica de la fuente 2.



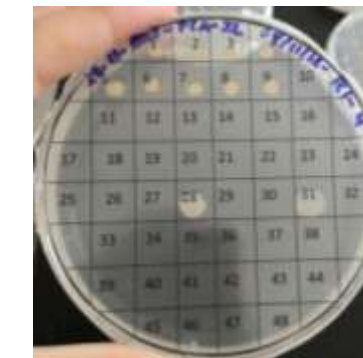
Primera réplica de la fuente 3.



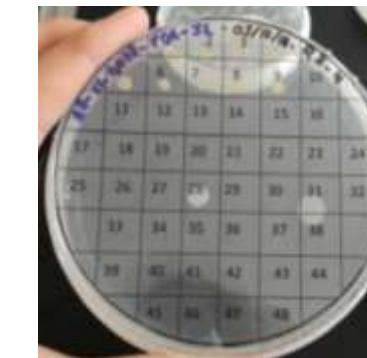
Segunda réplica de la fuente 3.



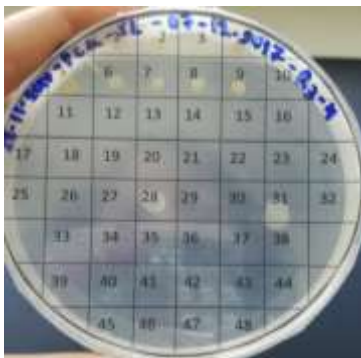
Tercera réplica de la fuente 3.



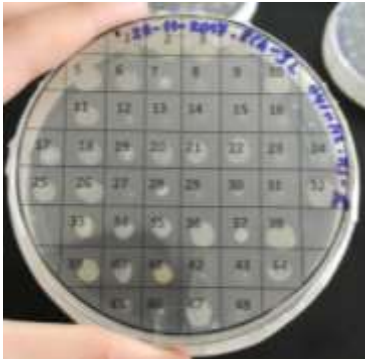
Primera réplica de la fuente 4.



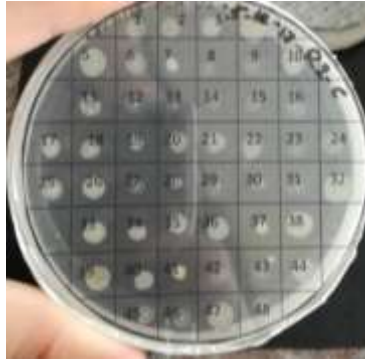
Segunda réplica de la fuente 4



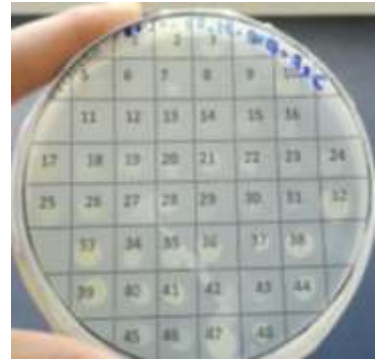
Tercera réplica de la fuente 4.



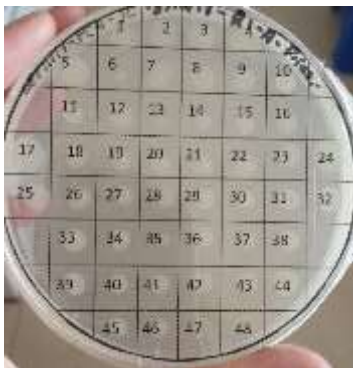
Primera réplica de la fuente 5



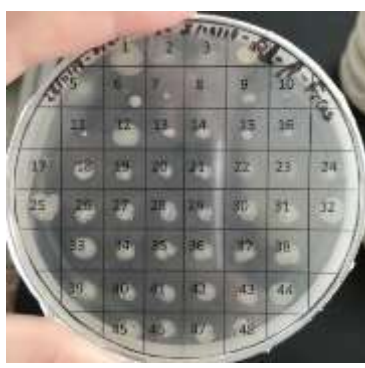
Segunda réplica de la fuente 5



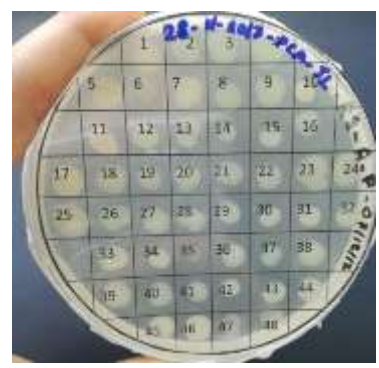
Tercera réplica de la fuente 5



Primera réplica de la fuente 6



Segunda réplica de la fuente 6



Tercera réplica de la fuente 6



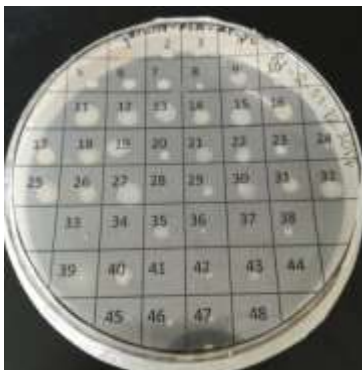
Primera réplica de la fuente 7



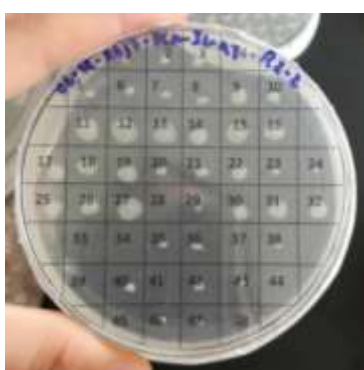
Segunda réplica de la fuente 7.



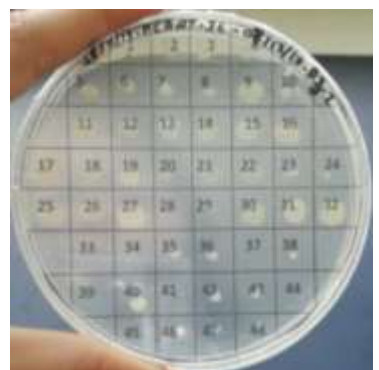
Tercera réplica de la fuente 7



Primera réplica de la fuente 8.



Segunda réplica de la fuente 8

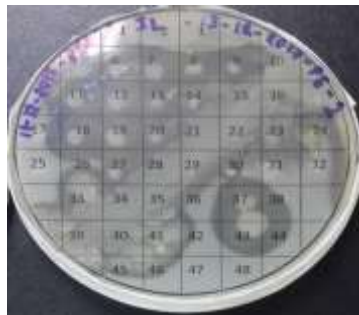


Tercera réplica de la fuente 8.

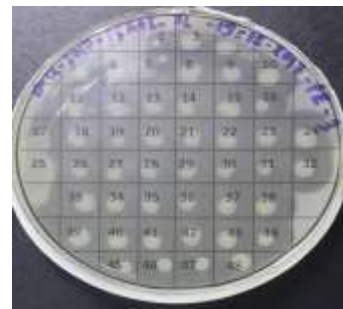
Anexo D: Pruebas enzimáticas en los aislados bacterianos y medición del índice de potencia de actividad enzimática.



Pruebas Enzimáticas en medio LD para los aislados bacterianos de la Fuente 1.



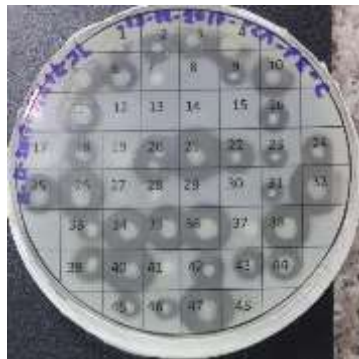
Pruebas Enzimáticas en medio LD para los aislados bacterianos de la Fuente 2.



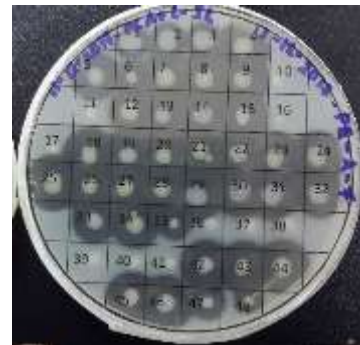
Pruebas Enzimáticas en medio LD para los aislados bacterianos de la Fuente 3.



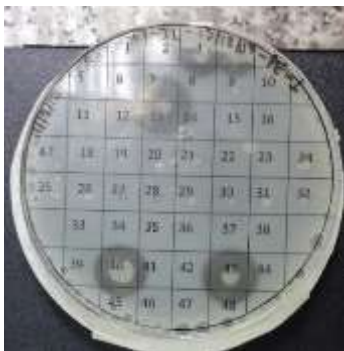
Pruebas Enzimáticas en medio LD para los aislados bacterianos de la Fuente 4.



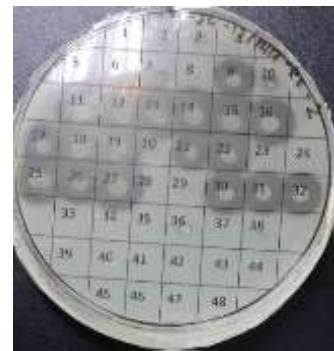
Pruebas Enzimáticas en medio LD para los aislados bacterianos de la Fuente 5.



Pruebas Enzimáticas en medio LD para los aislados bacterianos de la Fuente 6.



Pruebas Enzimáticas en medio LD para los aislados bacterianos de la Fuente 7.



Pruebas Enzimáticas en medio LD para los aislados bacterianos de la Fuente 8.



Replica 1 de la Fuente 1 para la determinación del IPP



Replica 2 de la Fuente 1 para la determinación del IPP.



Replica 3 de la Fuente 1 para la determinación del IPP



Replica 1 de la Fuente 2 para la determinación del IPP



Replica 2 de la Fuente 2 para la determinación del IPP.



Replica 3 de la Fuente 2 para la determinación del IPP.



Replica 1 de la Fuente 3 para la determinación del IPP



Replica 2 de la Fuente 3 para la determinación del IPP.



Replica 3 de la Fuente 3 para la determinación del IPP.



Replica 1 de la Fuente 4 para la determinación del IPP.



Replica 2 de la Fuente 4 para la determinación del IPP.



Replica 3 de la Fuente 4 para la determinación del IPP



Replica 1 de la Fuente 5 para la determinación del IPP



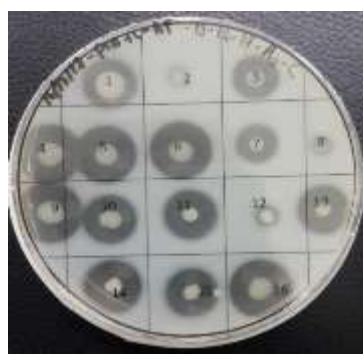
Replica 2 de la Fuente 5 para la determinación del IPP



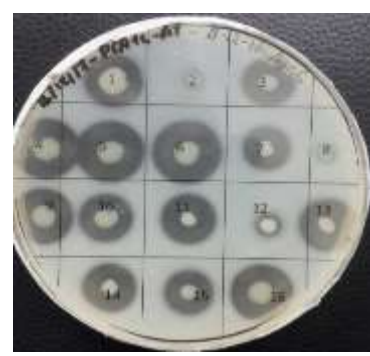
Replica 3 de la Fuente 5 para la determinación del IPP



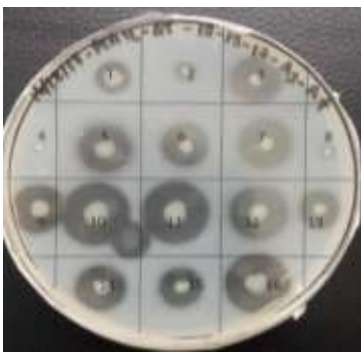
Replica 1 de la Fuente 6 para la determinación del IPP



Replica 2 de la Fuente 6 para la determinación del IPP



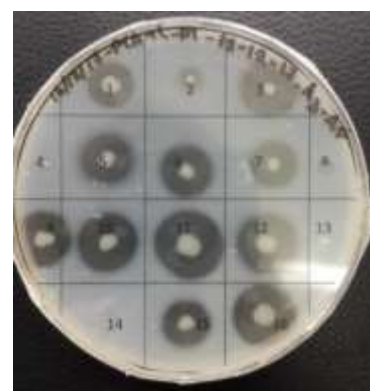
Replica 3 de la Fuente 6 para la determinación del IPP



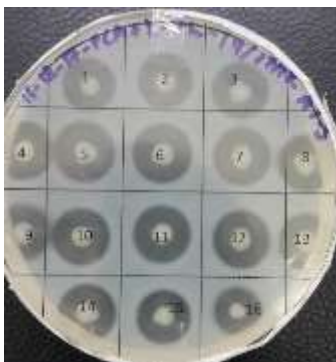
Replica 1 de la Fuente 7 para la determinación del IPP



Replica 2 de la Fuente 7 para la determinación del IPP



Replica 3 de la Fuente 7 para la determinación del IPP



Replica 1 de la Fuente 8 para la determinación del IPP

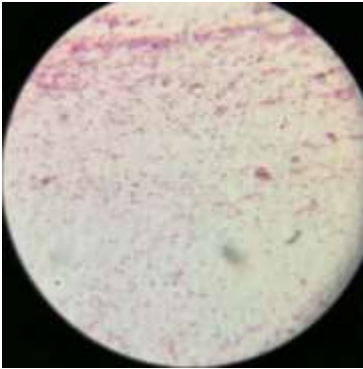


Replica 2 de la Fuente 8 para la determinación del IPP.

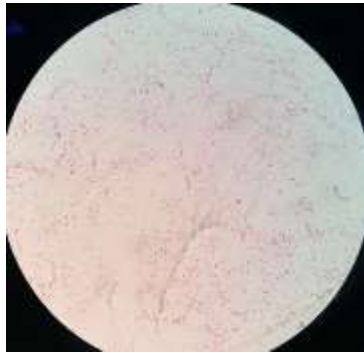


Replica 3 de la Fuente 8 para la determinación del IPP.

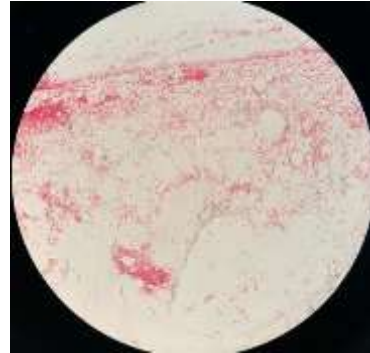
Anexo E: Observación microscópica de los aislados bacterianos.



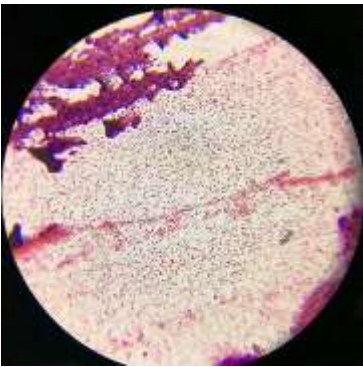
Aislado Bacteriano 1



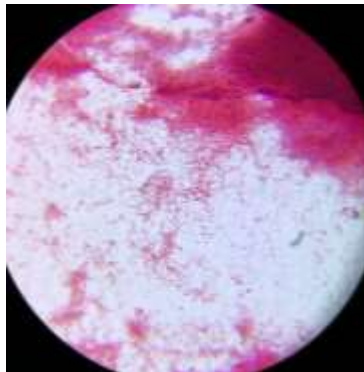
Aislado Bacteriano 2



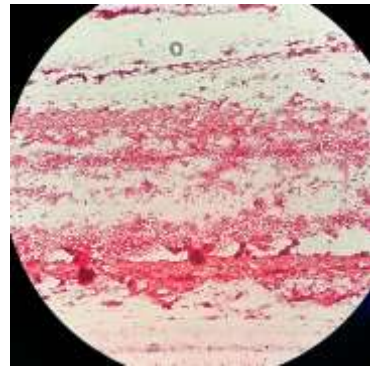
Aislado Bacteriano 3



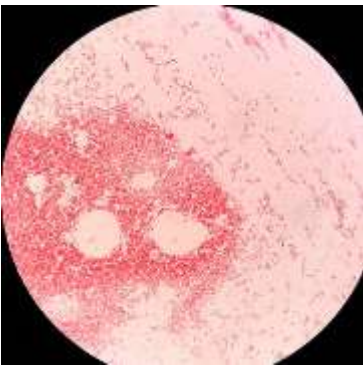
Aislado Bacteriano 11.



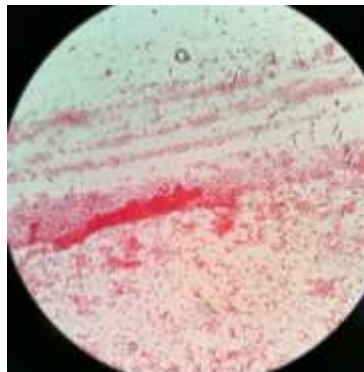
Aislado Bacteriano 13.



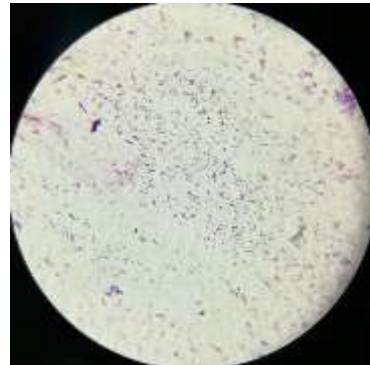
Aislado Bacteriano 15.



Aislado Bacteriano 16.



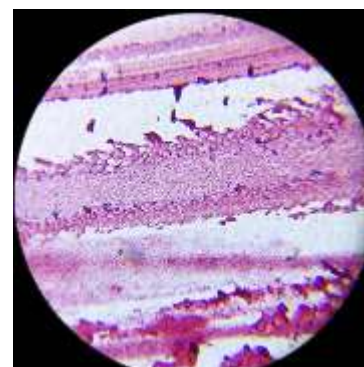
Aislado Bacteriano 17.



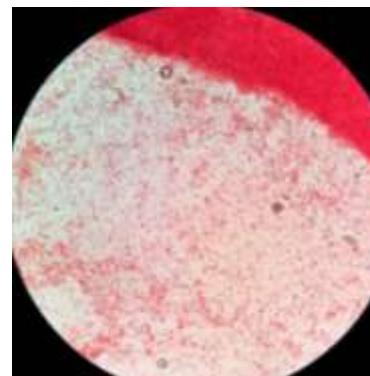
Aislado Bacteriano 18.



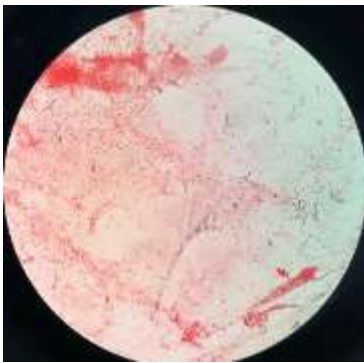
Aislado Bacteriano 19



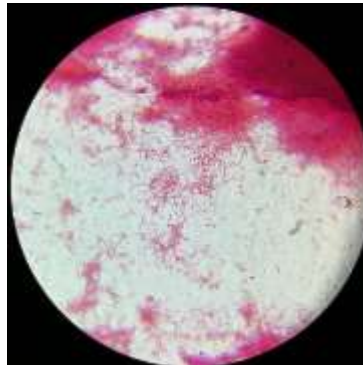
Aislado Bacteriano 20.



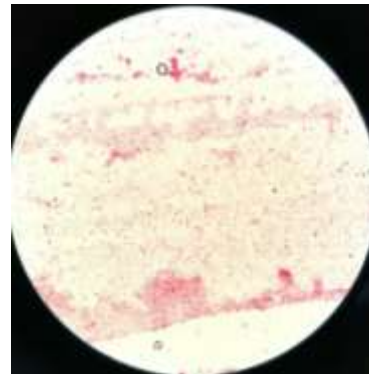
Aislado Bacteriano 24



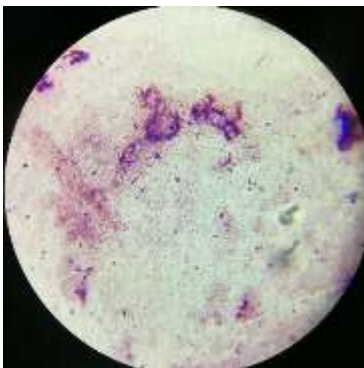
Aislado Bacteriano 26



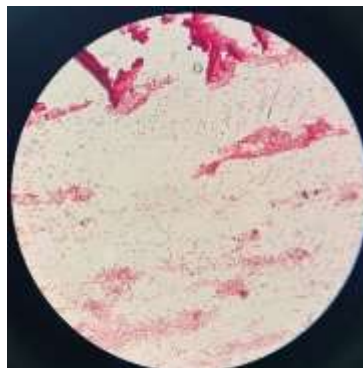
Aislado Bacteriano 30.



Aislado Bacteriano 37.



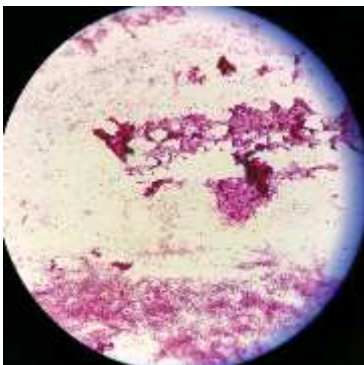
Aislado Bacteriano 45



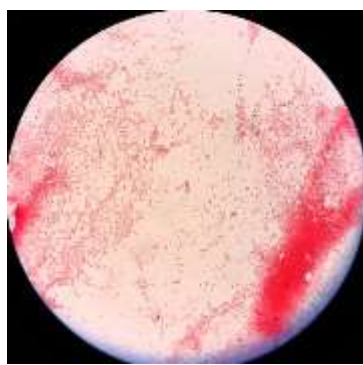
Aislado Bacteriano 46.



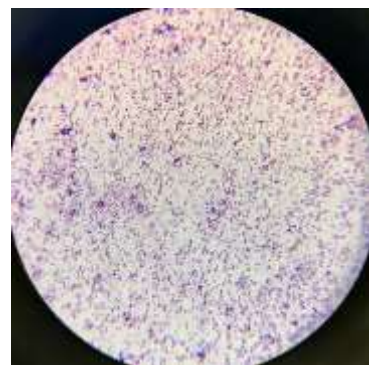
Aislado Bacteriano 51.



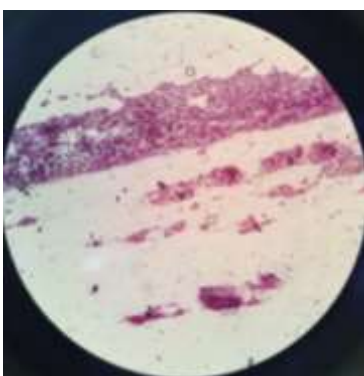
Aislado Bacteriano 53.



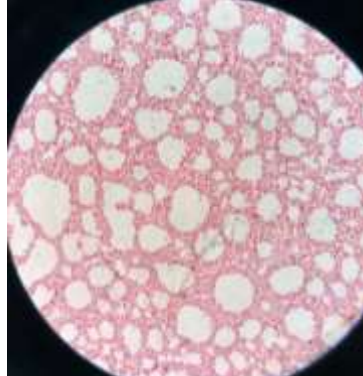
Aislado Bacteriano 54.



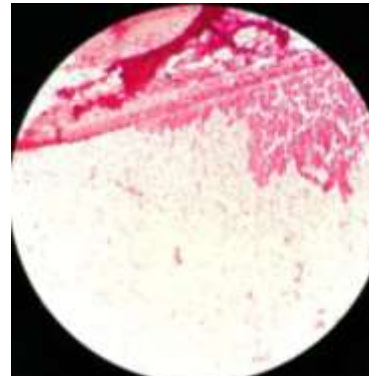
Aislado Bacteriano 56.



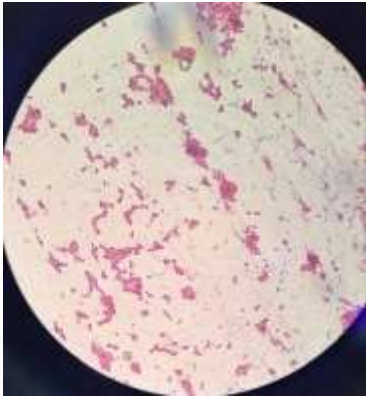
Aislado Bacteriano 57.



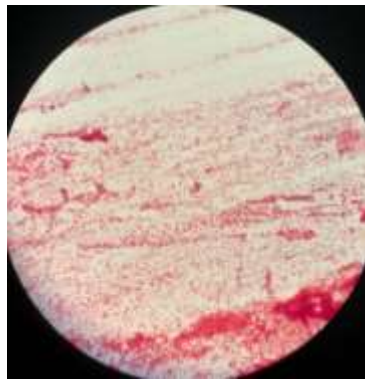
Aislado Bacteriano 59.



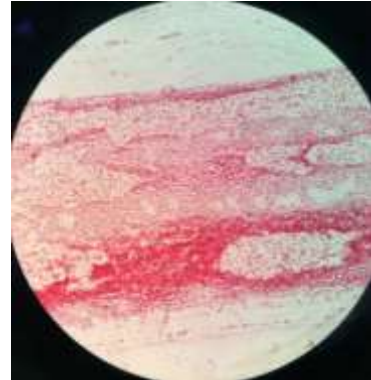
Aislado Bacteriano 60.



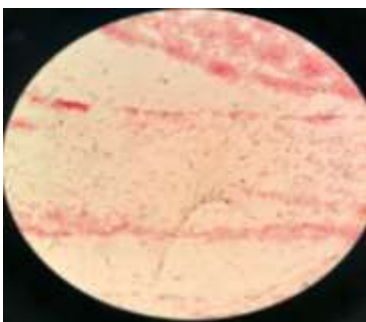
Aislado Bacteriano 61



Aislado Bacteriano 64



Aislado Bacteriano 73



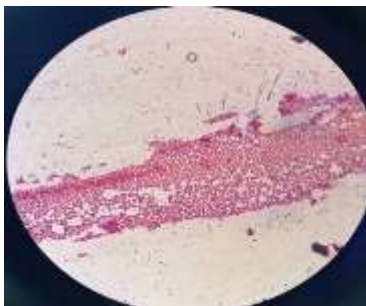
Aislado Bacteriano 79



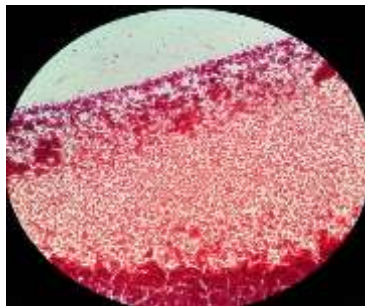
Aislado Bacteriano 80



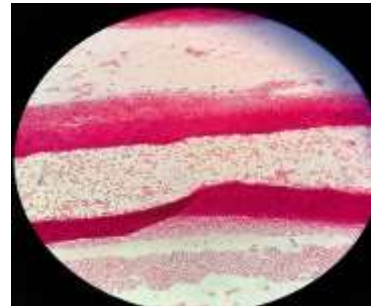
Aislado Bacteriano 81



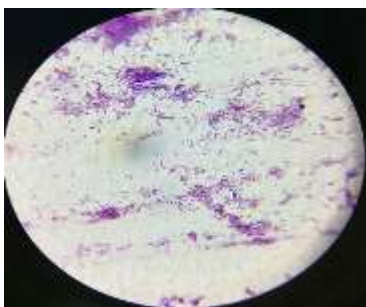
Aislado Bacteriano 84



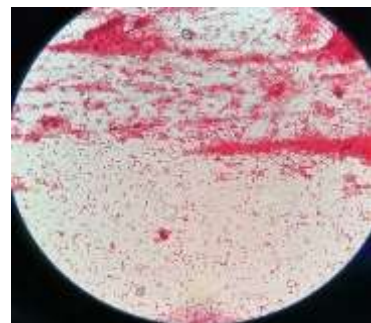
Aislado Bacteriano 86



Aislado Bacteriano 88



Aislado Bacteriano 97



Aislado Bacteriano 111

Anexo F: Observación macroscópica y pruebas bioquímicas de los aislados bacterianos.

Prueba de manitol



Aislado Bacteriano 2



Aislado Bacteriano 19



Aislado Bacteriano 30



Aislado Bacteriano 48.



Aislado Bacteriano 59.



Aislado Bacteriano 73

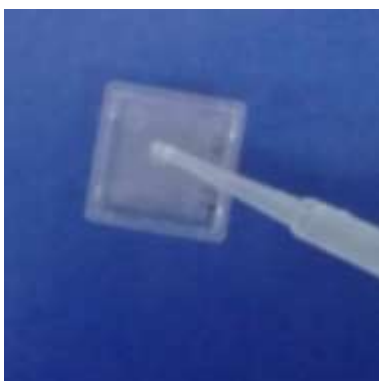


Aislado Bacteriano 87



Aislado Bacteriano 111

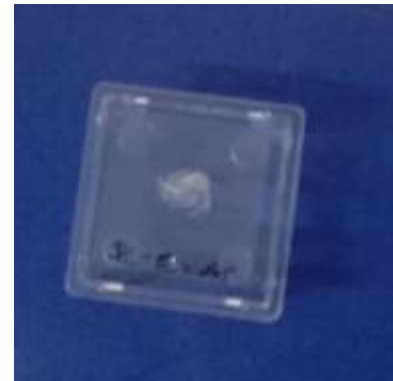
Prueba de la Catalasa



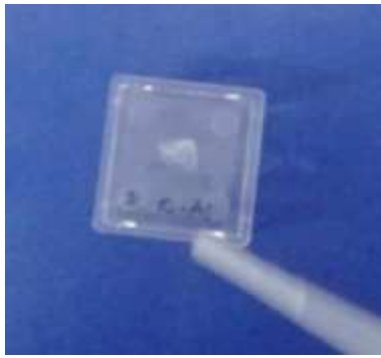
Aislado Bacteriano 2



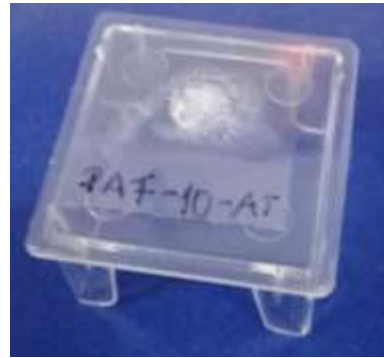
Aislado Bacteriano 19



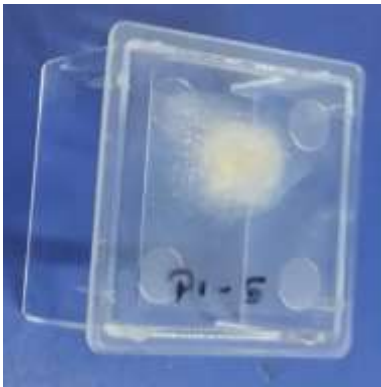
Aislado Bacteriano 30



Aislado Bacteriano 48.



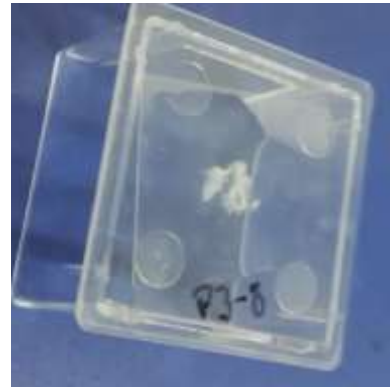
Aislado Bacteriano 59.



Aislado Bacteriano 73



Aislado Bacteriano 87



Aislado Bacteriano 111.

Prueba de la Urea



Aislado Bacteriano 2



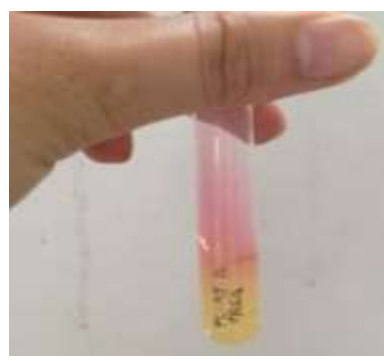
Aislado Bacteriano 19



Aislado Bacteriano 30.



Aislado Bacteriano 48.



Aislado Bacteriano. 59



Aislado Bacteriano 73



Aislado Bacteriano.87



Aislado Bacteriano. 111

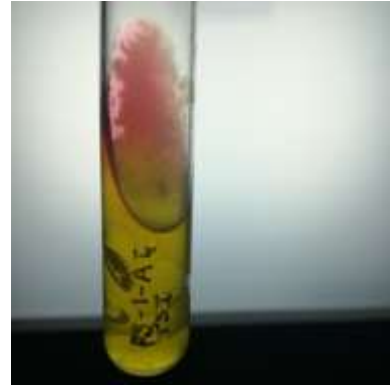
Prueba de TSI



Aislado Bacteriano 2



Aislado Bacteriano 19



Aislado Bacteriano 30



Aislado Bacteriano 48



Aislado Bacteriano 59



Aislado Bacteriano 73



Aislado Bacteriano 87



Aislado Bacteriano 111

Prueba de SIM



Aislado Bacteriano.2



Aislado Bacteriano 19



Aislado Bacteriano.30



Aislado Bacteriano 48



Aislado Bacteriano 59



Aislado Bacteriano73



Aislado Bacteriano 87



Aislado Bacteriano111