



Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS Y AMBIENTALES “ECAA”

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

**AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS DE AMBIENTES FRÍOS PARA
REMOCIÓN DE PLOMO EN CONDICIONES DE LABORATORIO.**

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN CIENCIAS AMBIENTALES Y ECODESARROLLO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Línea 3. Conservación de la Biodiversidad

Sublínea 3.1 Estudio, Conservación y Manejo de la Biodiversidad

AUTOR: ALVARO MAURICIO ARCINIEGA CHICAIZA

ASESOR: MSc. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

IBARRA, MARZO 2019



CERTIFICACIÓN

Ibarra, Marzo del 2019

MsC. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE
ASESOR DE TESIS

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que adjunta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra PUCE-SI; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f) 

MsC. Santiago Xavier Mafla Andrade
ASESOR DEL PROYECTO DE GRADO
C.C: 1002658399



APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinado, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f) 
MsC. Santiago Xavier Mafla Andrade
ASESOR DEL PROYECTO DE GRADO
C.C: 10026588399

(f) 
Dra. Yadira Ordóñez
LECTORA DEL PROYECTO DE GRADO
C.C:1103764864

(f) 
MsC. Diego León
LECTOR DEL PROYECTO DE GRADO
C.C:1711668895



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Alvaro Mauricio Arciniega Chicaiza, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, Marzo del 2019

(f)

Alvaro Mauricio Arciniega Chicaiza

AUTOR DEL PROYECTO DE GRADO

C.C: 1003601091



AUTORÍA

Yo, Alvaro Mauricio Arciniega Chicaiza, portador de la cédula de ciudadanía N° 1003601091, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Alvaro Mauricio Arciniega Chicaiza', is written over a horizontal line.

(f) _____

Alvaro Mauricio Arciniega Chicaiza

AUTOR DEL PROYECTO DE GRADO

C.C: 1003601091



DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo Alvaro Mauricio Arciniega Chicaiza, con CC: 1003601091, autor del trabajo de grado titulado: “AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS DE AMBIENTES FRÍOS PARA REMOCIÓN DE PLOMO EN CONDICIONES DE LABORATORIO”, previo a la obtención del título profesional de Ingeniería en ciencias Ambientales y Ecodesarrollo, en la Escuela de Ciencias Agropecuarias y Ambientales

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, Marzo del 2019

Alvaro Mauricio Arciniega Chicaiza

C.C. 1003601091



DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: “AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS DE AMBIENTES FRÍOS PARA REMOCIÓN DE PLOMO EN CONDICIONES DE LABORATORIO.”, lo propuesto en el código de Ética de la Investigación y Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 15 de enero de 2018.

Para constancia firma:

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Alvaro Mauricio Arciniega Chicaiza', is written over a horizontal line.

(f) _____

Alvaro Mauricio Arciniega Chicaiza

C.I: 1003601091

Ingeniería en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo



DEDICATORIA

Esta investigación dedico a Dios y a las personas que de una u otra manera fueron de soporte para llegar a culminar esta meta.

ALVARO MAURICIO ARCINIEGA CHICAIZA



AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, por cuidar de cada paso dado y por haberme permitido llegar hasta este punto de mi vida.

A mi abuelita Marujita, que gracias a sus consejos y al apoyo brindado he logrado llegar a cumplir esta meta, no hubiese sido posible lograrlo sin su apoyo.

A mis padres Yesenia y Kley, por estar a mi lado en cada derrota y en cada victoria apoyándome incondicionalmente.

A mis hermanas que con sus ocurrencias alegran mi vida y demostrarles que todo es posible.

A Karlita que es mi compañera de vida y que con su amor y apoyo me ha motivado para cumplir cada objetivo trazado.

A mi asesor de tesis, M.Sc Santiago Mafla quien con sus conocimientos y paciencia logró guiarme a lo largo de este trabajo.

A Carlos y Sandra por la paciencia y apoyo brindado a lo largo de la carrera universitaria y a todas las personas que me acompañaron y fueron de apoyo a lo largo de este sueño; familia, amigos y docentes, gracias infinitas a cada uno de ustedes por creer en mí. ¡Esta investigación es por y para ustedes!

ALVARO MAURICIO ARCINIEGA CHICAIZA

ÍNDICE.

CARÁTULA.....	i
CERTIFICACIÓN	ii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iii
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS	iv
AUTORÍA	v
DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN.....	vi
DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN	vii
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTO	ix
ÍNDICE.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS.	13
ÍNDICE DE ANEXOS	14
1 RESUMEN	15
2 ABSTRACT.....	16
3 INTRODUCCIÓN	17
3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
3.2 JUSTIFICACIÓN	19
3.3 OBJETIVOS	21
3.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3.4 HIPÓTESIS	21
4 ESTADO DEL ARTE	22
5 MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 Diseño Experimental.....	27
5.2 Tratamientos:	27

5.3	Toma de Muestras.....	28
5.4	Caracterización Física de las Muestras.	28
5.4.1	pH.....	29
5.4.2	Conductividad.....	29
5.4.3	Aislamiento de Microorganismos.....	30
5.4.4	Absorción Atómica.....	30
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1	Caracterización física de las muestras obtenidas en el nevado Cayambe mediante técnicas de laboratorio.	33
6.1.1	Potencial Hidrogeno (pH).....	34
6.2	Conductividad eléctrica	36
6.3	Aislamiento de cepas bacterianas mediante agar nutritivo LB.....	37
6.4	Análisis de reducción de plomo con aplicación de bacterias psicrófilas	38
6.5	Socialización.....	46
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
7.1	Conclusiones.....	49
7.2	Recomendaciones	50
8	BIBLIOGRAFÍA	51
9	ANEXOS	56

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Análisis de varianza ADEVA del diseño experimental.....	27
Tabla 2. Criterios de Calidad admisibles para la prevención de flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario.....	34
Tabla 3. Estándares de Calidad Ambiental para la conservación de flora y fauna.....	36
Tabla 4. Viabilidad microbiana a temperatura ambiente, refrigeración y estufa.....	38
Tabla 5. ANOVA del porcentaje residual de plomo mediante la aplicación de bacterias psicrófilas aplicadas en concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg.l ⁻¹	39
Tabla 6. Prueba Tukey al 5% para cada tratamiento en concentración 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg.l ⁻¹	40
Tabla 7. Secuencias relativas	44

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Recolección de muestras	28
Figura 2. Equipo de absorción atómica para detección de metales pesados.....	31
Figura 3. Curva de calibración de blanco para lectura de Pb.	31
Figura 4. Puntos de recolección de muestras.	33
Figura 5. Potencial de hidrógeno de los puntos de muestreo PA, PH y CM, y límite máximo permisible para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario, y límite máximo permisible de descarga a un cuerpo de agua dulce.	35
Figura 6. Conductividad Eléctrica de los puntos de muestreo PA, PH y CM, y límite máximo permisible para la preservación de la flora y fauna.....	37
Figura 7. Porcentaje residual de plomo tras la aplicación de bacterias psicrófilas en concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg.l ⁻¹ del metaloide.	40
Figura 8. Porcentaje residual de plomo con la utilización de bacterias psicrófilas obtenidas en el punto CM, PA y PH.....	41
Figura 9. Porcentaje residual de plomo con la utilización de bacterias psicrófilas aplicadas en concentración de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg.l ⁻¹ del metaloide.	42
Figura 10. Tabulación de la organización del evento	46
Figura 11. Tabulación de Ejecución del evento por parte del Expositor.....	47
Figura 12. Tabulación de Medición de Impacto de la Investigación.....	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medición de pH.....	56
Anexo 2. Medición de Conductividad	57
Anexo 3. Aislamiento de Cepas Bacterianas	58
Anexo 4. Siembra de bacterias psicrófilas en caldo nutritivo LB a diferentes concentraciones	59
Anexo 5. Filtrado de muestras previo al análisis de absorción atómica	60
Anexo 6. Lista de asistentes de socialización	61
Anexo 7. Encuesta realizada a los asistentes	62

1 RESUMEN

El plomo dentro del organismo en altas cantidades puede ser perjudicial para el cuerpo, el límite máximo permisible en humanos es de $10 \mu\text{g}.\text{dl}^{-1}$ si se excede este nivel puede conllevar a sufrir dolores de cabeza, náusea, mareo y hasta la muerte; esta investigación ayuda a mitigar la presencia excesiva de metales pesados y la contaminación que conlleva su mal manejo, con ayuda de bacterias de ambientes fríos psicrófilas se verificó si es viable o no un proceso de biorremediación.

Para verificar la viabilidad de biotransformación de las bacterias psicrófilas se realizó un proceso de aislamiento de cepas bacterianas mediante agar nutritivo LB, el objetivo fue reproducir las bacterias, se obtuvo una colonia por cada siembra en cada caja Petri al cabo de 72 horas, a temperatura ambiente en la cámara de flujo laminar “laboratorio” (19°C), refrigeración (3°C); no se obtuvo resultado positivo a temperatura de estufa (29°C), este último resultado se debe a que este grupo de bacterias son de ambientes fríos y su desarrollo óptimo es de 0 a 15°C .

Las muestras fueron sometidas a una concentración de plomo de $0.1 \text{ mg}.\text{l}^{-1}$ que es el porcentaje de plomo máximo permisible en el cuerpo humano, posteriormente se fue duplicando sus concentraciones es decir 0.2 , 0.4 y $0.8 \text{ mg}.\text{l}^{-1}$ todas las muestras fueron sometidas a las condiciones de temperaturas antes mencionadas con el fin de verificar la capacidad de biotransformación y resistencia de las bacterias psicrófilas, este estudio comprobó que la temperatura es un factor determinante.

Se comprobó el porcentaje de reducción de plomo en las muestras positivas obtenidas, este análisis se lo realizó en los laboratorios de la PUCESI mediante la técnica de llama en el equipo de absorción atómica obteniendo un resultado positivo en las muestras: “Cascada Mirlos” CM (1.80), “Punto Agua” PA (1.87) y “Punto Hielo” PH (2.40) estos valores corresponden al residuo del 100% en cada valor, obtenidos estos resultados se llegó a la conclusión que las bacterias del punto CM a una concentración de $0.08 \text{ mg}.\text{l}^{-1}$ fueron las más efectivas en este proceso.

Palabras Clave: Psicrófilas, Cascada Mirlos (CM), Punto Agua (PA), Punto Hielo (PH).

2 ABSTRACT

Lead within the body in high amounts can be harmful to the body, the maximum permissible limit in humans is $10 \mu\text{g.dl}^{-1}$ if this level is exceeded it can lead to headaches, nausea, dizziness and even death; Due to this problem, which is becoming more and more evident, this research was carried out to help mitigate the excessive presence of heavy metals and the contamination that this mismanagement entails, with the help of bacteria from cold psychrophilic environments, it was verified whether a process is viable or not. of bioremediation.

To verify the viability of biotransformation of the psychrophilic bacteria, a process of isolation of bacterial strains was carried out by means of LB nutritive agar in which the objective was to reproduce the bacteria, a colony was obtained for each sowing in each Petri dish after 24 hours, at room temperature (19°C), refrigeration (3°C); no positive result was obtained at stove temperature (29°C), this last result is due to the fact that this type of bacteria are from cold environments, that is, their optimum development is from 0 to 15°C .

The samples were subjected to a concentration of 0.1 mg.l^{-1} which is the maximum permissible percentage of lead in the human body, later it was doubling its concentrations ie 0.2-0.4 and 0.8 mg.l^{-1} All the samples were subjected to the temperature conditions mentioned above in order to verify the capacity of biotransformation and resistance of the psychrophilic bacteria, this study proved that the temperature is a determining factor for its development since it was positive for the ambient and refrigeration temperatures and negative with a 100% mortality rate for the stove temperature.

The percentage of lead reduction in the positive samples obtained was checked, this analysis was performed using the atomic absorption technique obtaining a positive result: CM (1.80), PA (1.87) and PH (2.40) these values correspond to the residual of 100% in each value, obtained these results it was concluded that the bacteria of the CM point were the most optimal in this process.

Keywords: Psychrophiles, Mirlos Waterfall (CM), Water Point (PA), Ice Point (PH).

3 INTRODUCCIÓN

Las bacterias pueden estar presentes en estado natural en una gran diversidad de ambientes, en algunos casos no llegan a cumplir con las condiciones óptimas para su desarrollo adecuado, por lo cual tienen que desarrollar estrategias de adaptación en el medio en el que se localicen para desarrollarse en diferentes condiciones. En la actualidad la biotecnología ha tomado mayor interés en la investigación de estos microorganismos de ambientes extremos ya que sus características enzimáticas tanto de bacterias como de hongos despierta el interés para una investigación más minuciosa. (Sanchez, 2016).

Los microorganismos que se encuentran sometidos a condiciones estresantes, como bajas temperaturas, aridez, escasa disponibilidad de nutrientes, alta salinidad, bajo o elevado pH, presión y radiación UV, son catalogados como extremófilos, término que surgió en 1974 y engloba a aquellos organismos bajo una clasificación artificial, es decir, son pobladores de ambientes hostiles, diferenciándolos de algunos organismos que crecen en ambientes “intermedios”, es decir, microorganismos mesófilos. (Ramírez, 2016)

Estas bacterias psicrófilas se desarrollan óptimamente en una temperatura de 15 °C y no por encima de 24°C; también están las bacterias psicrotolerantes que se desarrollan en temperaturas entre 15 °C y su desarrollo es acelerado a temperaturas superiores a 25 °C. Estas bacterias dependen del medio en el que se les encuentre para poder desarrollar sus actividades enzimáticas con normalidad ya que se ha determinado que en su temperatura adecuada producen enzimas como la proteasa, amilasa, deshidrogenasas y lipasas que funcionan óptimamente en frío y se desnaturalizan rápidamente a temperaturas moderadas. Algunas bacterias psicrófilas contienen ácidos grasos poco insaturados e hidrocarburos de cadena larga y dobles enlaces múltiples. (Villalta, 2014)

El 2% de la población de Cayambe realiza sus descargas de aguas servidas a un cuerpo de agua cercana lo que provoca una alta contaminación y el mayor problema es que en estas zonas altas las comunidades consumen el agua con un escaso tratamiento de potabilización, lo que les hace vulnerables a enfermedades. Estos microorganismos son de gran interés para diferentes industrias y servicios ambientales, ya que gracias a las enzimas

producidas (denominados extremozimas) permiten la remediación de ambientes contaminados. (Capdevielle, 2012)

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día se puede evidenciar claramente el deterioro del medio ambiente debido a distintos factores provocados por las actividades antropogénicas; uno de estos factores es la contaminación de la capa superficial de la tierra y por consiguiente los cuerpos de agua subterráneos mediante el proceso de lixiviación, los metales pesados en cantidades elevadas es tóxico y mortal para todos los seres vivos siendo causante de alteraciones físicas y químicas en los ecosistemas naturales y en el cuerpo humano (Coto, 2013).

Sin embargo en la naturaleza podemos encontrar diversos microorganismos y bacterias como por ejemplo las psicrófilas que se han desarrollado con el tiempo debido a las condiciones y factores que se presentan en la actualidad y han evolucionado para poder sobrevivir a estas circunstancias como las altas concentraciones de metales pesados a las que se ven expuestos. (Coto, 2013)

El plomo dentro del organismo en altas cantidades puede ser perjudicial para el cuerpo, provocando dolores de cabeza, náusea, mareo y hasta la muerte; debido a este problema que es cada vez más evidente se realizó una investigación que ayude a mitigar la presencia excesiva de metales pesados y la contaminación que conlleva su mal manejo, con ayuda de bacterias de ambientes fríos psicrófilas se verificó si es viable o no un proceso de biorremediación. (Angelova, 2004)

A este fenómeno de mitigar la contaminación de un medio mediante el uso de organismos y bacterias especializadas en este tratamiento se lo llama biorremediación.

Por esta razón se analizó diferentes estrategias y métodos para lograr la biorremediación eficaz con el fin de reducir el nivel de metales pesados en especial el plomo que se encuentra en el agua de forma natural. (Angelova, 2004)

El valor límite de concentración de plomo en sangre (plumbemia) se establece en 10 microgramos de plomo por decilitros de sangre ($10 \mu\text{g}.\text{dl}^{-1}$). Se consideran admisibles plumbemias entre 10 y $19 \mu\text{g}.\text{dl}^{-1}$ de sangre. (Castillo et al., 2005)

3.2 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se puede evidenciar la excesiva presencia de metales pesados en los cuerpos de agua subterráneos y superficiales y esto se debe al incremento de la industria en general consecuentemente los productos de hoy en día contienen más componentes químicos que al cumplir su vida útil dejan como desechos metales pesados. Estos residuos no son degradables, y el mal uso de estos desechos provoca la contaminación del suelo superficial e incluso sufrir un proceso de lixiviación que afecta a los cuerpos de agua y suelo subterráneo.

Si bien es cierto el plomo en cantidades menores a ($10 \mu\text{g}.\text{dl}^{-1}$) en el cuerpo humano no se ve afectado o es despreciable, sin embargo los productos agrícolas de consumo diario se ven afectados por esta presencia de plomo en el suelo e incorporan una cantidad mínima en su producto final y al ser consumido se obtiene un incremento de plomo en la persona que lo ingiere y si no se realiza un control puede sufrir afecciones graves en su sistema interno, de igual forma sucede con el agua de consumo humano. (Burt, 2003)

Por ejemplo la actividad de minería es una de las fuentes que más contaminación aporta de metales pesados, debido a las condiciones artesanales en que se desarrolla dentro de la misma, sus descargas de agua residual con altos niveles de concentración de metales pesados son arrojadas directamente a cuerpos de agua cercanos y al no tener un control por parte de las autoridades pertinentes este proceso sigue perjudicando permanentemente a los cuerpos de agua que son descargados.

Otro foco de contaminación son los centros de transferencia y rellenos sanitarios que son albergue de una infinidad de materiales que contienen plomo y en estos lugares al ser desechados se degradan en el suelo y el plomo tiende a filtrarse hasta llegar a un cuerpo de agua subterráneo o a su vez quedar disperso en el suelo. (Burt, 2003)

Biorremediación es el proceso por el cual los organismos vivos son empleados para la descontaminación efectiva de un sistema contaminado. Dicho proceso explota la diversidad genética y la versatilidad metabólica de los microorganismos para transformar contaminantes en productos finales menos tóxicos, los cuales se acumulan en su biomasa reduciendo la concentración del contaminante en el medio. (Chavez, 2007)

La biorremediación es clasificable según el lugar donde se lleve a cabo, de esta forma cuando el tratamiento se hace en el mismo lugar natural donde ocurre la contaminación se le llama biorremediación in situ y cuando se toman muestras de suelo o agua contaminada y se trasladan a otro lugar para ser tratadas en un laboratorio, plantas de tratamiento o bioláminas, se habla de biorremediación ex situ. A nivel experimental se practica la biorremediación in vitro como una manera de mantener las condiciones de trabajo controladas. (Chavez, 2007)

La bioprospección de este tipo de microorganismos ha tenido un crecimiento sostenido en los últimos años en ambientes distribuidos en todo el mundo, considerando las aplicaciones alcanzadas en diferentes industrias y servicios ambientales (remediación de ambientes contaminados), así como el potencial de uso industrial de las enzimas producidas por estos organismos (denominadas extremozimas). (Capdevielle, 2012)

El fenómeno de biosorción se trata básicamente de la captación pasiva de los iones metálicos en la superficie de células de materiales biológicos inactivos, en donde se da lugar a la participación de fenómenos tales como quimisorción, fisorción, quelación, complejación, intercambio iónico y microprecipitación (Volesky, 2007).

La biosorción provee una gran variedad de ventajas, entre las que se destacan las siguientes: evita que en los organismos vivos haya efectos tóxicos derivados del metal, hace posible que no se necesite de nutrimentos para el desarrollo de los microorganismos, acelera la remoción del metal, el biosorbente es un subproducto derivado de procesos industriales por lo tanto es de bajo presupuesto y se tiene la posibilidad de recuperar tanto el biosorbente como el metal, por lo tanto se genera una reducción en costos de operación.

En la actualidad el proceso de biosorción de metales pesados por materiales biológicos inactivos es considerado como una alternativa viable para remover metales pesados de aguas residuales provenientes de industrias y de aguas de origen freático y superficial, debido a la gran eficiencia que tiene y a su bajo costo, principalmente cuando los metales están en bajas concentraciones (Rodriguez, 2009; Volesky, 2007).

Los psicrófilos se han convertido en un importante recurso para la prospección biológica, debido a sus adaptaciones únicas al frío. Los psicrófilos tienen éxito en sobrevivir en estas condiciones gracias a la optimización de diversos procesos celulares básicos. Una de estas adaptaciones es la producción de enzimas con una alta actividad específica a bajas temperaturas. (EIB-PUCV, 2011).

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 OBJETIVO GENERAL

- Aislar cepas bacterianas de ambientes fríos Psicrófilas mediante agares nutritivos LB enriquecido con plomo para verificar la capacidad de biotransformación y resistencia de los microorganismos estresados en el medio de cultivo.

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar físicamente la muestra obtenida del nevado Cayambe, mediante análisis de laboratorio.
- Aislar cepas bacterianas Psicrófilas mediante un medio de cultivo LB enriquecido con plomo en concentraciones de 0.1 mg.l⁻¹, 0.2 mg.l⁻¹, 0.4 mg.l⁻¹ y 0.8 mg.l⁻¹ respectivamente.
- Socializar la investigación y resultados a la comunidad de la PUCESI.

3.4 HIPÓTESIS

- **H₀:** El aislamiento de cepas bacterianas de ambientes fríos Psicrófilas mediante caldos nutritivos LB enriquecidos con plomo permitirá identificar aquellas más resistentes al estrés sometido para la biorremediación de aguas contaminadas con plomo.

Variables Dependientes: pH- Conductividad- Pb

Variables Independientes: Bacterias de ambientes fríos Psicrófilas.

4 ESTADO DEL ARTE

El plomo es un metal que se ha usado extensamente desde la antigüedad, Este metal afecta sistemas, órganos y tejidos y su efecto puede ser proporcional a la cantidad presente en el organismo. Pero los umbrales de sus efectos tóxicos varían en diferentes individuos. Los niños generalmente absorben una mayor proporción del plomo y con un efecto más severo que los adultos, porque están en un proceso activo de desarrollo y por ciertas características fisiológicas, patológicas y de conducta.

Los servicios de salud pública pueden identificar áreas en que la población tiene un riesgo mayor de intoxicación con plomo y establecer condiciones para el despistaje, identificación temprana y tratamiento de las personas afectadas. La determinación de plomo en sangre venosa es la prueba más sensible de exposición al plomo. Se recomienda que los niveles en sangre se mantengan debajo de $10 \mu\text{g.dl}^{-1}$. (Herrera et al., 2015)

En la biorremediación in vitro se puede emplear un sin número de métodos y técnicas ya que la facilidad de poder controlar los ambientes es más eficaz por esta razón lo más común en esta técnica es el uso de microorganismos como las bacterias, protozoos, algas y hongos por tal razón esta investigación con el uso de bacterias de ambientes fríos psicrófilas verificó la viabilidad de la mitigación del plomo en el agua para poder realizar la biorremediación. (Sepúlveda, 2005)

Las actividades industriales son el foco de mayor contaminación con metales pesados como (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Co, Ag, Au) esto dependiendo de la industria puede hacer la descarga de estos metales pesados en la atmosfera, en el suelo y fuentes hídricas, siendo la última la más importante ya que los cuerpos de agua son fuente de abastecimiento para el consumo humano y si tiene presencia de estos metales pesados y en especial el plomo la salud de la comunidad que la consuma se ve seriamente afectada por consumir esta agua con altos niveles de plomo. (López et al., 2014)

El impacto ambiental de los contaminantes metálicos en suelos y sedimentos es estrictamente dependiente de la capacidad de acomplejamiento de éstos con componentes del medio ambiente y su respuesta a las condiciones fisicoquímicas y biológicas de su entorno. Los metales son especies químicas no degradables, por tal motivo, una vez volcados al medio ambiente, sólo pueden distribuirse entre los entornos aire - agua - suelo,

a veces cambiando su estado de oxidación, o bien pueden incorporarse a los seres vivos de manera que con esta investigación se verificó una reducción considerable del nivel del plomo presente en el agua con el uso de estas bacterias de ambientes fríos “psicrófilas”. (Chavez, 2007)

Saber si la vida es metabólicamente activa a temperaturas bajo cero es fundamental para definir el papel ecológico de los microorganismos en los sistemas de heladas. Las células durmientes en los ambientes congelados son sumideros para: carbono, nitrógeno, fósforo y otros nutrientes vitales, mientras que las células metabólicamente activas son participantes dinámicos en los ciclos biogeoquímicos (Pastuzo, 2013)

La remediación de estos ambientes contaminados mediante la utilización de métodos químicos involucra procesos de costos excesivamente altos debido a la especificidad requerida. Por otra parte, la utilización de métodos biológicos para remediar un ambiente contaminado (biorremediación) ofrece una alta especificidad en la remoción del metal de interés con flexibilidad operacional, tanto en sistemas in situ como ex situ. (Vullo, 2003)

El rol de los microorganismos es fundamental en los ciclos biogeoquímicos de los metales y su utilización en los procesos de biorremediación de desechos sólidos y líquidos es esencial para el cuidado del medio ambiente. Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y/o tolerantes que son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes y participar en el proceso de biorremediación. (Vullo, 2003)

Los microorganismos pueden transformar los metales de dos formas, una es la movilización del metal en la que se hace pasar de un estado insoluble inicial a otro soluble final, proceso conocido también como lixiviación microbiana. La otra forma de transformación es la inmovilización del metal, es decir, el paso de un estado soluble inicial a uno insoluble final en fase sólida, y existen diferentes mecanismos que utilizan los microorganismos para lograr la inmovilización del metal, como la biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción. (Vullo, 2003)

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, zinc y cobre. Consiste en la

incorporación del metal a las células de manera pasiva (independiente de energía), mediante interacción química con componentes de la pared celular. (Chavez, 2007)

La biotransformación de los microorganismos es un mecanismo que implica que el metal pesado haya transcurrido una serie de cambios químicos que se pueden dar en su estado de metilación o de oxidación. El resultado que produce esta transformación biológica en los metales que son tóxicos es la formación de compuestos que sean volátiles o poco solubles en agua. Un claro ejemplo de esto es el ciclo del plomo en la naturaleza, en donde por acción de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* se da lugar a transformaciones de reducción del catión Pb^{2+} a Pb^0 , seguido de esto otros microorganismos pueden metilarlo dando como resultado compuestos como CH_3Pb^+ y $(CH_3)_2Pb$ los cuales son volátiles y mucho más tóxicos que el plomo (Vullo, 2003).

Una clasificación de las bacterias es de acuerdo al nivel de temperatura en el que crecen y cumplen con sus funciones vitales con normalidad, por ejemplo, las bacterias Psicrófilas que viven en ambientes extremos, tienen una temperatura mínima de crecimiento de $0^{\circ}C$ o menor y una temperatura máxima de desarrollo por debajo de los $24^{\circ}C$, viven y cumplen sus funciones vitales en ambientes fríos, como en nevados, sitios polares e incluso en sedimentos marinos es decir en el mar profundo.

Las bacterias psicrófilas que se encuentran en zonas polares o en lo profundo del mar son consideradas Gram negativas de diferentes tipos: Alfa, Beta y Grammaproteobacteria, por ejemplo, la bacteria *Shewanella sp* capaz de reducir el metal y aporta con la biomineralización del hierro. (Madigan, 2014)

Existen investigaciones de bacterias psicrófilas, como Detección Molecular y Fenotípica de Proteínas Csp en Bacterias Psicrotolerantes, Aisladas del Territorio Patagónico y Antártico que dio como resultado que el estrés en frío induce la síntesis de un patrón de proteínas caracterizado por un aumento de las proteínas de bajo peso molecular, consistente con la inducción de proteínas tipo Csp. (Rojas, 2011)

La membrana citoplasmática, actúa como barrera esencial y separa el interior del exterior celular. Así mismo, es necesario tener en cuenta que en situaciones o ambientes hostiles y adversos no logra defender su estructura por si sola. La composición de la membrana

bacteriana es una bicapa lipídica hidrofóbica compuesta por ácidos grasos, así como unidades hidrofílicas como el glicerol hacia el exterior, posee un gran contenido de proteínas que se mueven libremente a través de la bicapa y confiere a la membrana dos cualidades la elasticidad y la permeabilidad. (Aliaga, 2015)

La estructura multifuncional que posee la membrana le permite llevar a cabo procesos metabólicos esenciales para la preservación de la viabilidad microbiana, razón por la cual, en los procesos de congelación pese a que la célula es sometida a cambios biofísicos y químicos del ambiente, logra adaptarse; una hipótesis de lo que sucede en este proceso, está relacionada directamente con el transporte pasivo que la célula hace con el agua, donde la no utilización de protectores llevaría a la salida de agua del interior de la célula para compensar el aumento de las concentraciones de soluto en el exterior a consecuencia de la formación de núcleos de hielo. Otro aspecto importante a considerar es el tamaño de las células procariotas, en términos generales el hecho de que sean células tan pequeñas les ofrece una serie de ventajas biológicas. (Pírez, 2013)

A menor tamaño, mayor velocidad y eficiencia en el intercambio de nutrientes, es decir, una de estas ventajas es la relacionada con el ritmo en el que los nutrientes y las sustancias de desecho pasan del interior al exterior de las células y viceversa, esta relación es inversamente proporcional al tamaño de la célula afectando los ritmos metabólicos y de crecimientos. Por lo tanto, la velocidad de transporte es directamente proporcional a la superficie de la membrana celular, situación que explica el por qué las células procariotas alcanzan mayores tamaños de población en espacios cortos de tiempo. Esta tasa de crecimiento y los tamaños de población permite causar cambios en la fisicoquímica de un ecosistema en tiempos cortos. (Sánchez, 2005)

Claro está, todo este recambio se realiza a través de la membrana plasmática la cual a pesar de su alta permeabilidad actúa a la vez como filtro seguro en el cumplimiento de todas las funciones fisicoquímicas, nutricionales, desintoxicantes y de adaptación al medio ambiente impidiendo así el paso libre de los compuestos polares, compuestos pequeños no polares y sustancias solubles en fases hidrofóbicas como por ejemplo los ácidos grasos, los alcoholes y bencenos, sustancias polares que son capaces de atravesar la barrera libremente gracias a la solubilidad en la fase lipídica. Si esta se rompe, sencillamente la viabilidad de la célula finaliza. (Madigan, 2014)

En la actualidad existen varios artículos relacionados con dichas bacterias, como el Estudio polifásico de bacterias psicrófilas colectadas en la isla Greenwich, obtuvo como resultado que las bacterias psicrófilas crecieron a 4°C tanto en medio líquido como en sólido, excepto la cepa UG-PA-004 la cual creció en medio líquido a una temperatura de 4-24°C formando aglomeraciones. En medio sólido formó colonias a 20°C. Bahía Chile (Continente Antártico), esta investigación fue realizada en la Universidad de Guayaquil.

La membrana celular de las bacterias psicrófilas produce desaturasas que son catalizadores que reducen la saturación de los ácidos grasos pre-existentes en la membrana y esta es regulada positivamente a baja temperatura. (Rodrigues, y otros, 2008.)

En la pared celular de estos organismos los transportadores de membrana y otras proteínas unidas a la membrana esta reguladas por las bajas de temperatura. Es probable que refleje una compensación para la baja eficiencia del transportador a baja temperatura. En el frío el transporte en la membrana y la difusión se ven obstaculizados por la reducida permeabilidad de membrana y menor rendimiento termodinámico. (Kurihara & Esaki, 2008).

Soria. (2009), evaluó la producción de enzimas lipolíticas de cinco cepas bacterianas antárticas crecidas en medio aceite de oliva durante 36 a 74 horas, a su temperatura óptima de crecimiento (cepas: 27a y 173d de 20-25°C, para 7Ab de 25-30°C, para 19b de 15-20°C y para 134d de 10-15°C). Las cinco cepas crecieron bien y se detectó actividad lipolítica y/o estereolítica en todas las cepas.

Un estudio muy similar se dio en la bacteria *Rhodococcus equi* que fue inmovilizada en una cama de celulosa para el tratamiento de agua contaminada por plomo en un reactor a escala de laboratorio. En el ensayo se emplearon diversas concentraciones del metaloide y se obtuvo una eficiencia máxima del 95% de remoción (Bag, Bhattacharya, & Chowdhury, 2010). En otro estudio a escala laboratorio, se probó la eficacia de gránulos de porcelana cubiertos con la cepa *Azetobacte* en donde finalizado el experimento los investigadores demostraron que se obtenía una remoción del 70% del metaloide. (Kurihara & Esaki, 2008).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño Experimental.

En la investigación se realizó el diseño experimental DCA (Diseño completamente al azar) con arreglo factorial $A \times B$, el diseño nos permitió comparar los factores A (puntos de muestreo) y B (concentración de plomo) para determinar la efectividad de las bacterias, se realizó una prueba Tukey al 5 % para determinar la significancia de absorbancia que poseen las bacterias.

5.2 Tratamientos:

T1: 0.1 mg.l^{-1}

T2: 0.2 mg.l^{-1}

T3: 0.4 mg.l^{-1}

T4: 0.8 mg.l^{-1}

Los tratamientos mencionados hacen referencia al límite máximo permisible de plomo en el cuerpo humano teniendo como concentración inicial 0.1 mg.l^{-1} y de esta forma duplicando su concentración hasta llegar a 0.8 mg.l^{-1} este proceso se lo realizó para verificar la absorbancia del metaloide por medio de las bacterias psicrófilas.

Tabla 1.

Análisis de varianza ADEVA del Diseño Experimental

FUENTES DE VARIACIÓN	GL
Total	35
Tratamientos	11
Factor punto de muestreo	2
Factor concentración	3
Interacción PMxCN	6
Error Exp	24

Fuente: El Autor.

5.3 Toma de Muestras.



Figura 1. Recolección de muestras

Fuente: El Autor.

Se recolectaron las muestras en tres puntos previamente identificados en el Nevado Cayambe, según Lima en el estudio realizado en el 2018 indica la presencia de bacterias psicrófilas en los puntos de muestreo que se recolectaron las muestras, con la ayuda de frascos de vidrio totalmente esterilizados en el autoclave a 121°C y 1.5 atm por 45 minutos; los puntos se tomó con la ayuda de un GPS eXplorist 500 de MAGELLAN; el primer punto se tomó como punto de muestreo el río Monjas con una altitud 4680 msnm, a 5 cm de la capa de hielo; para el segundo punto se seleccionó una vertiente de agua producto del descongelamiento que salía del Nevado con una altitud de 4120 msnm; el tercer punto fue tomado en una quebrada denominada “Los Mirlos” con una altitud de 3880 msnm; seguidamente, se transportaron las muestras a una temperatura de 3°C al Laboratorio de Biotecnología de la Escuela ECAA de Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

5.4 Caracterización Física de las Muestras.

La caracterización física es de gran importancia ya que se puede verificar las posibles alteraciones existentes que hayan podido suceder a través del tiempo es posible que estas

alteraciones pueden darse por el cambio climático y son parte de los factores principales que contribuye a las posibles alteraciones presentes en el agua, se la realizó con el fin de conocer la calidad del agua y verificar los niveles de pH y conductividad eléctrica en el que se encuentran ya que estos factores son de gran importancia para el desarrollo de las bacterias psicrófilas que se encuentran en el nevado Cayambe. Los parámetros tomados en cuenta para esta caracterización son: pH, conductividad.

5.4.1 pH.

Este análisis se tomó en cuenta para conocer si el agua del nevado Cayambe se encuentra en un estado ácido entre 0 a 6, neutro que equivale a 7 o alcalino de 8 a 14. El agua permisible para el ser humano tiene un valor de 7, es decir, es un agua sana y de bajo control; para el desarrollo óptimo de los microorganismos el pH debe ser neutro o ligeramente ácido es decir debe estar entre 5 a 8 según la escala de pH, el análisis fue realizado en cada una de las muestras en estado líquido con un potenciómetro ExStik® Modelo PH100. Para medición en campo del fabricante EXTECH®.

El pH es uno de los factores principales para el acondicionamiento óptimo de los microorganismos en un medio determinado, facilitando el aprovechamiento de nutrientes, su reproducción y desarrollo sus funciones vitales de manera eficiente (Castrillón, Bedoya, & Montoya, 2006).

5.4.2 Conductividad.

La conductividad es la capacidad que tiene un material de dejar pasar a través de él la corriente eléctrica. Para conocer la conductividad del agua hay que saber de qué tipo de agua hablamos. El agua pura, no conduce la electricidad. Sin embargo prácticamente todo el agua con la que estamos en contacto (en el grifo, mineral, lluvia, mar...) no es agua pura, sino que es agua con una disolución de sales en diferente concentración. Las sales dentro del agua tienen la capacidad de transportar la energía eléctrica. Dado que toda el agua con la que estamos en contacto tiene sales disueltas, el agua con la que estamos en contacto si conduce electricidad. Dada esta relación tan directa entre la salinidad y la conductividad, la conductividad se utiliza para medir la salinidad del agua.

La conductividad de las muestras se midió con el equipo que cuenta los laboratorios de la PUCESI “conductímetro Hach”. La conductividad en el agua se mide a través de un sistema amperimétrico (midiendo la corriente) o potenciométrico (midiendo la potencia). Cuanta mayor intensidad pase o mayor potencia se genere, mayor será la conductividad,

5.4.3 Aislamiento de Microorganismos.

Es necesario este proceso para poder replicar las bacterias existentes en las muestras; para el aislamiento de las bacterias tomadas, se preparó 180 ml de Agar LB se dispuso homogéneamente e igualitariamente este preparado en cajas Petri previamente autoclavadas, se colocó 1 ml de cada muestra en los medios de cultivo y se dejó reposar por 72 horas, tres cajas Petri se les sometió a una temperatura de 3°C, las otras tres muestras se les expuso a una temperatura ambiente de 19°C y las otras tres muestras se les ingreso en la estufa a una temperatura entre 29°C.

Transcurridas 72 horas se obtuvo colonias de bacterias mayoritariamente de las cajas Petri que se les sometió a temperaturas frías y al ambiente, las muestras que se les expuso a una temperatura de 29°C no obtuvieron la eficiencia esperada, esto debido a las condiciones de calor y humedad en la que se encontraban. Se preparó 180 ml de agar nutritivo Lb con el máximo permisible de plomo en los humanos ($720 \mu\text{g} \cdot \text{dl}^{-1}$) y se dispuso en tubos de ensayo; con la ayuda de una aza se recolectó las bacterias de las cajas Petri y se sembró en cada uno de los tubos de ensayo y se dejó reposar por 72 horas en las mismas condiciones de temperatura mencionados anteriormente.

Este proceso se repitió de la misma forma y en las mismas condiciones pero duplicando las concentraciones en tres ocasiones. Finalmente se obtuvo tres tubos de ensayo de cada concentración y se les realizó un proceso de filtrado previo al análisis de absorción atómica.

5.4.4 Absorción Atómica.

Para el análisis se trabajó con un espectrofotómetro de Absorción Atómica SensAA© de GBC Scientific Equipment. Debido a la naturaleza del metal se usó la técnica de absorción atómica (GFAAS) por medio del Sistema llama.



Figura 2. Equipo de absorción atómica para detección de metales pesados.
Fuente: El Autor

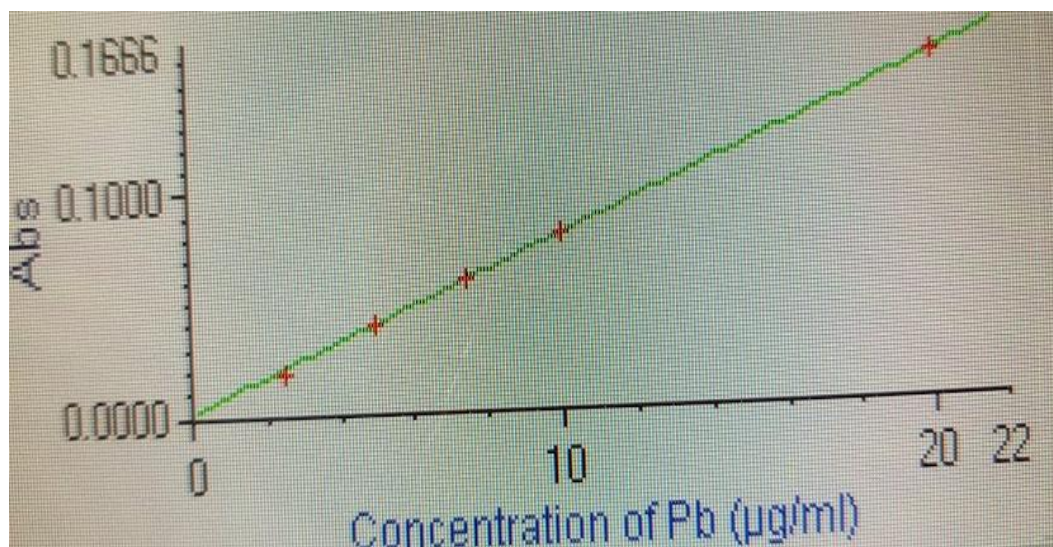


Figura 3. Curva de calibración de blanco para lectura de Pb.
Fuente: El Autor.

El ajuste de la lámpara de Plomo (Pb) fue el siguiente:

- Corriente de la lámpara (mA): 8.00
- Longitud de onda (nm): 193.70
- Amplitud de la abertura (nm): 1.00
- Elevación de la abertura: Normal

Para la calibración de la curva y el blanco se utilizó un estándar de 100 ppm, a partir del cual el equipo preparó 4 estándares; el primero con una concentración de 5 ppm y una absorbancia de 0.192, el segundo con una concentración de 10 ppm y una absorbancia de 0.257, el tercero con una concentración de 15 ppm y una absorbancia de 0.341 y el cuarto con una concentración de 20 ppm y una absorbancia de 0.530.

El modo de calibración fue “Linear LS (Least Squares) Through Zero” con un máximo error de 0.3056. Este valor se obtiene del valor entre R y R^2 donde R es el valor de la concentración y R^2 es el valor de absorbancia del blanco en el instante de la calibración. Siendo R : 0.9997 y R^2 : 0.9973.

Una vez el equipo debidamente calibrado y las muestras previamente filtradas fueron puestos en la plaqueta del equipo para proceder a dar lectura de las mismas, el equipo fue programado en unidades ppm ya que estas unidades se manejaron en las concentraciones de las muestras.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización física de las muestras obtenidas en el nevado Cayambe mediante técnicas de laboratorio.



Figura 4. Puntos de recolección de muestras.
Fuente: El Autor

Mediante una salida de campo se reconocieron los tres puntos de muestreo con previos datos de la presencia de bacterias Psicrófilas (Lima, 2018) y estos puntos son: río Monjas con una altitud 4680 msnm, el primer punto se obtuvo a 5 cm de la capa de hielo al que se le llamo PH (punto hielo); para el segundo punto se seleccionó una vertiente de agua del nevado con una altitud de 4120 msnm, se le dio el nombre de PA (punto agua); el tercer punto fue tomado en una quebrada denominada “Los Mirlos” a una altura de 3880 msnm, se le dio el nombre de CM (Cascada Mirlos); se transportaron las muestras en recipientes herméticamente esterilizados a una temperatura de 3°C al Laboratorio de Biotecnología de la Escuela ECAA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

6.1.1 Potencial Hidrogeno (pH)

La caracterización del pH en el agua es un indicador principal para estimar la calidad de ésta, determinando su acidez o alcalinidad. Dentro de la ubicación de las zonas de muestreo, se evidenció la presencia de animales silvestres y domésticos, al igual que una abundante flora; por tal motivo se tomó en cuenta para este parámetro (pH), los criterios de calidad admisibles del agua expuestos en el Libro VI del Anexo 1, para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario. Así también los puntos de muestro fueron establecidos en zonas con asentamientos poblacionales cercanos al nevado Cayambe, de esta manera se toma en cuenta los límites de descarga a un cuerpo de agua dulce, presentes en el Texto Unificado de Legislación Secundaria Medio Ambiente (TULSMA).

Tabla 2.

Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario.

Parámetro	Expresado como	Límite máximo permisible
		Agua fría dulce
Potencial de hidrógeno	pH	6-9

Fuente. (Ministerio del Ambiente del Ecuador , 2017)



Figura 5. Potencial de hidrógeno de los puntos de muestreo PA, PH y CM, y límite máximo permisible para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario, y límite máximo permisible de descarga a un cuerpo de agua dulce.

Fuente: El Autor

En la figura 5 se observa que las muestras obtenidas en los puntos establecidos PA, PH y CM, con relación al potencial de hidrogeno se encontraron dentro del rango permisible que estipula la normativa para la preservación de flora y fauna, además de las descargas en cuerpos de agua dulce (TULSMA).

El pH es uno de los factores principales para el acondicionamiento óptimo de los microorganismos en un medio determinado, facilitando el aprovechamiento de nutrientes, su reproducción y desarrollo sus funciones vitales de manera eficiente (Castrillón, Bedoya, & Montoya, 2006).

Garzón. (2013), determinó la biodiversidad de las bacterias psicrófilas, teniendo en cuenta factores propios del medio de su origen, entre ellos el potencial de hidrogeno. Donde manifestó que el pH presente en función al origen de las mismas, las cataloga como bacterias neutrófilas, las cuales adquieren una buena adaptabilidad dentro de las condiciones óptimas en un rango de 5.5 a 8.

Las bacterias psicrófilas empleadas en la presente investigación corresponden al grupo bacteriano *Firmicutes*, las cuales reflejan una capacidad de crecimiento eficiente dentro de un rango de 6.5 a 9 dentro del pH (Zúñiga, 2002).

Los ejemplares obtenidos en los puntos de muestreo PA, PH y CM, en relación al pH, confieren las características óptimas para determinar la presencia de bacterias pertenecientes al grupo bacteriano *Firmicutes*, con carácter psicrófilo.

6.2 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica es un parámetro establecido dentro de la evaluación de la calidad del agua, pues este permite identificar la capacidad que presentó el recurso para conducir la corriente eléctrica debido a la presencia de iones disueltos (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, 2006).

Tabla 3.

Estándares de Calidad Ambiental para la conservación de flora y fauna.

Parámetro	Unidad	Límite máximo permisible
Conductividad		
Eléctrica	µS.cm	<2000

Fuente. (Constitución Política del Perú, 2008)

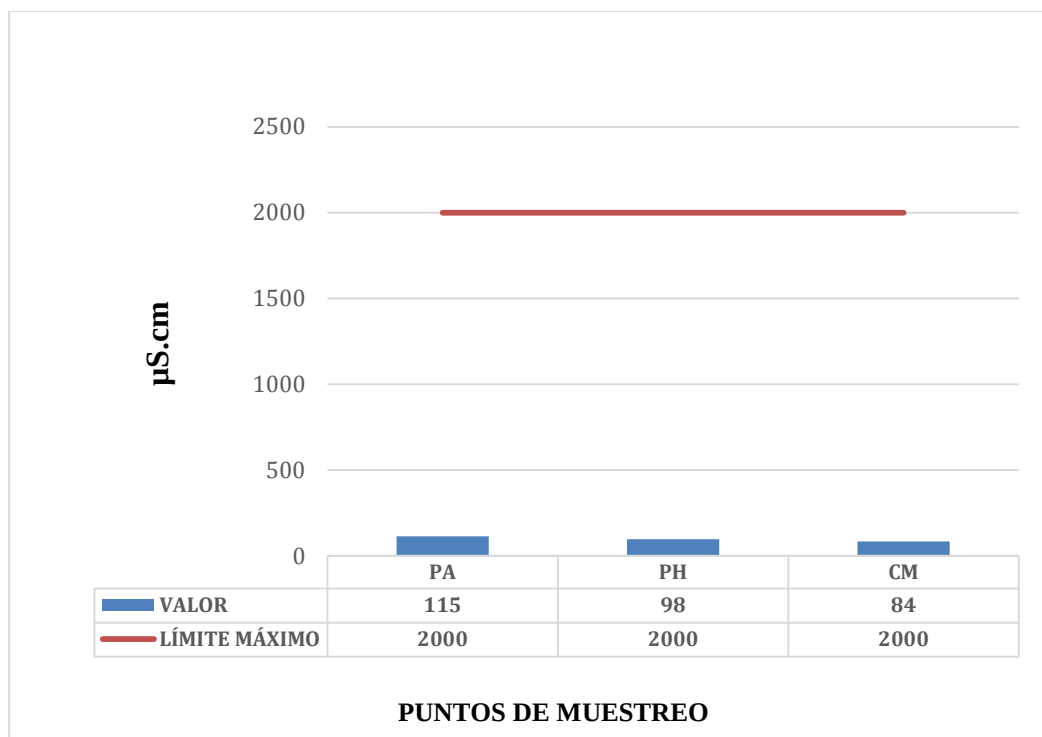


Figura 6. Conductividad Eléctrica de los puntos de muestreo PA, PH y CM, y límite máximo permisible para la preservación de la flora y fauna.
Fuente: El Autor

En la Figura 6 indica que las muestras obtenidas de los puntos establecidos PA, PH y CM, fueron comparadas con los Estándares de Calidad Ambiental para la conservación de la flora y la fauna emitidos por la Constitución de Perú, donde se define que dichas muestras se ubican dentro del rango establecido por dicha normativa.

6.3 Aislamiento de cepas bacterianas mediante agar nutritivo LB

El aislamiento de cepas bacterianas presentes en las distintas muestras obtenidas, se llevó a cabo por medio de la inoculación de las mismas en agar nutritivo LB, las cuales fueron colocadas para su reproducción en tres diferentes temperaturas: temperatura ambiente a 19°C, refrigeración a 3°C y estufa a 29°C. Dicha acción permitió identificar y establecer la temperatura óptima para la adaptabilidad y el crecimiento de dichas bacterias, dando como resultado final que la mejor adaptación fue a temperatura ambiente y refrigeración.

Ross y Toth, 1974; Cone, 1982; Hiu, 1984; Toranzo et al, 1993, citados por Chiroque en el 2014, mencionan que las condiciones de máxima tolerancia para la inoculación en un medio de cultivo de bacterias pertenecientes al phylum *Firmicutes* oscila entre 15 a 24°C a 48 horas. De esta forma se evidencia la viabilidad microbiana eficiente obtenida tras la aplicación de las dos temperaturas antes mencionadas.

Establecidas las condiciones óptimas para el crecimiento de las bacterias en relación a la temperatura, estas cepas resistentes a 10 µg.dl⁻¹, el cual es el límite máximo permisible para el cuerpo humano (Superintendencia Nacional de Servicios y Saneamiento, 2010), fueron sometidas a varias pruebas de tolerancia al plomo con las siguientes dosis; 0.1ppm, 0.2ppm, 0.4ppm y 0.8ppm; por un lapso de 72 horas.

Dicho proceso presentó como finalidad evaluar el efecto que el metaloide produce en el crecimiento bacteriano y el potencial de reducción que posee dichas cepas en las distintas concentraciones.

Tabla 4.

Viabilidad microbiana a temperatura ambiente, refrigeración y estufa.

Muestras	Viabilidad Microbiana		
	Concentración 0.01ppm (t° 3°C)	Concentración 0.01ppm (t° 19°C)	Concentración 0.01ppm (t° 29°C)
PA	POSITIVA	POSITIVA	NEGATIVA
PH	POSITIVA	POSITIVA	NEGATIVA
CM	POSITIVA	POSITIVA	NEGATIVA

Fuente: El Autor

6.4 Análisis de reducción de plomo con aplicación de bacterias psicrófilas

La Tabla 5 indica el análisis de varianza del porcentaje residual de plomo expresado en mg.l⁻¹, mediante la aplicación de bacterias psicrófilas empleadas bajo concentraciones de

0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg.l⁻¹, además señala que existen diferencias significativas (*) entre los distintos tratamientos empleados para la reducción de dicho metaloide.

El coeficiente de variación muestra un 0.001%, señalando que la toma de muestras bajo condiciones controladas en laboratorio, presenta un carácter de alta precisión.

Tabla 5.

ANOVA del porcentaje residual de plomo mediante la aplicación de bacterias psicrófilas aplicadas en concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg.l⁻¹.

		ADEVA			F TAB		SIGNIFICANCIA
FC	GL	SC	CM	Fcal	0.05	0.01	
Total	35	141.37					
Tratamientos	11	141.14	12.83	1332.73	2.22	3.09	*
Factor punto de muestreo	2	2.55	1.27	132.38	3.40	5.61	*
Factor concentración	3	124.19	41.40	4299.63	3.01	4.72	*
Interacción PMxCN	6	14.41	2.40	249.40	2.51	3.67	*
Error exp	24	0.23	0.01				
CV: 0.001 %							

Fuente: El Autor

Mediante la realización del análisis del ANOVA con relación al porcentaje residual del plomo, se determinó que existe una diferencia significativa entre la interacción del punto de muestreo con la concentración inicial del metaloide. De esta manera se procedió a realizar la prueba Tukey al 5%, con la finalidad de identificar las diferencias entre los tratamientos.

Tras la realización de la prueba Tukey al 5% (Tabla 6) se determinó la presencia de 11 grupos diferentes: PA 0.1 (a), CM 0.1 (b), CM 0.2 (c), PH 0.1 (d), PH 0.2 (e), PA 0.2 (f), PH 0.4 (g), PA 0.4 (h), PH 0.8 (i) y CM 0.8 (k); esto indica que existen diferencias significativas con relación al porcentaje de concentración final de plomo (mg.l⁻¹) tras la aplicación de bacterias psicrófilas obtenidas en el punto de muestreo PA, PH y CM, bajo

concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg.l⁻¹ del metaloide. El tratamiento PA 0.8 (j) y CM 0.4 (j) se encuentran en el mismo rango; lo que significa que el porcentaje final de reducción de plomo es similar entre sí.

Tabla 6.

Prueba Tukey al 5% para cada tratamiento en concentración 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg.l⁻¹

TRATAMIENTO	PORCENTAJE RESIDUAL de Pb (%)	Tukey 5%
PA 0.1	5.50	a
CM 0.1	5.30	b
CM 0.2	3.80	c
PH 0.1	3.57	d
PH 0.2	2.88	e
PA 0.2	1.32	f
PH 0.4	0.47	g
PA 0.4	0.38	h
PH 0.8	0.30	i
PA 0.8	0.28	j
CM 0.4	0.27	j
CM 0.8	0.22	k

Fuente: El Autor

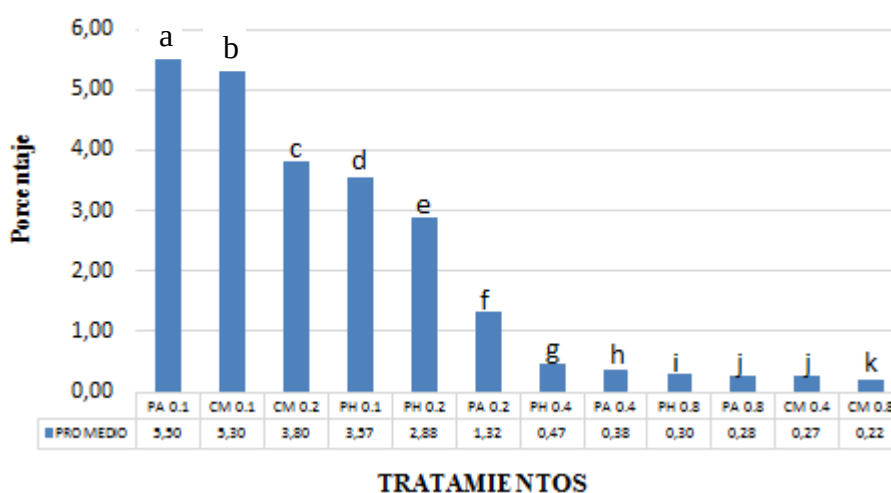


Figura 7. Porcentaje residual de plomo tras la aplicación de bacterias psicrófilas en concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg.l⁻¹ del metaloide.

Fuente: El Autor

En la figura 7 muestra la identificación de la significancia entre los factores evaluados; factor punto de muestreo y factor concentración inicial, se procedió a realizar la prueba

Tukey al 5% con la finalidad de determinar el mejor nivel para la reducción de plomo por bacterias psicrófilas según los factores A y B.

Tras el análisis de la prueba Tukey al 5% del Factor A que corresponde a los puntos de muestreo, determinó que los mismos presentan diferencias significativas entre sí.

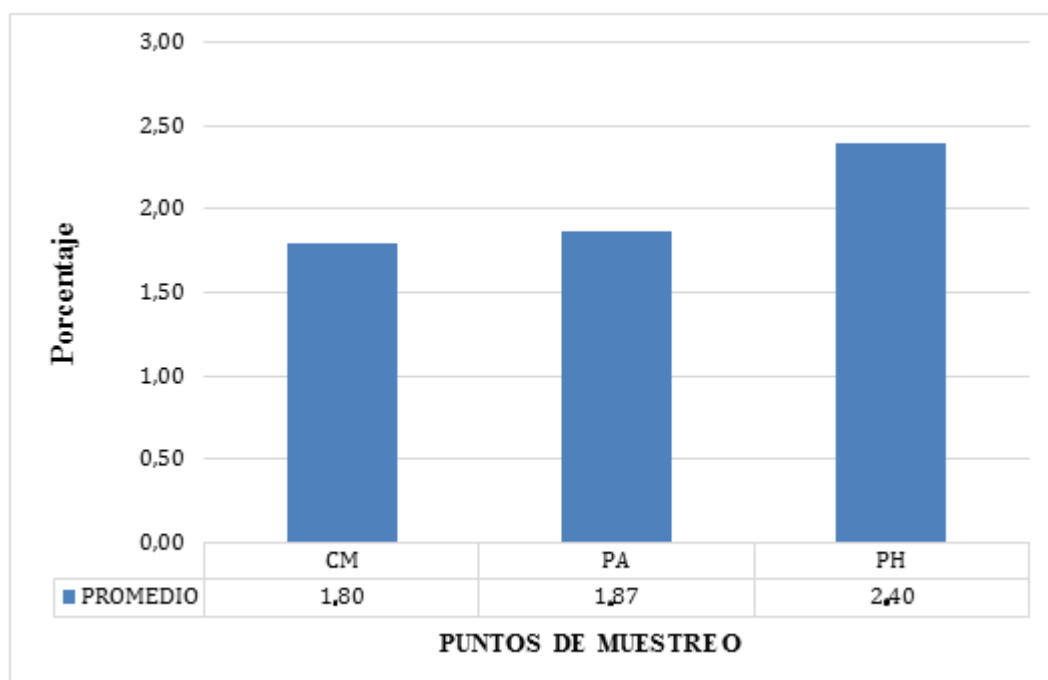


Figura 8. Porcentaje residual de plomo con la utilización de bacterias psicrófilas obtenidas en el punto CM, PA y PH.

Fuente: El Autor

En la figura 8 determina que el análisis de la prueba Tukey al 5% (Tabla 10) del Factor B que corresponde a la concentración de plomo; 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg.l⁻¹, determinó que los mismos presentan diferencias significativas entre sí.

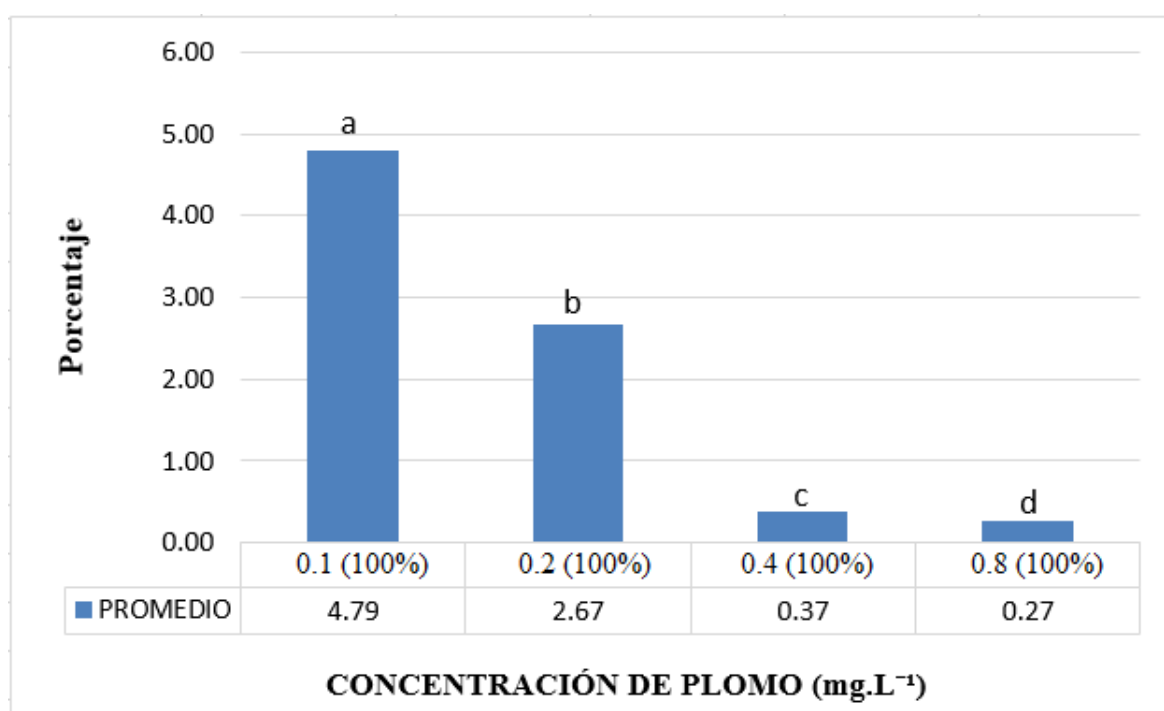


Figura 9. Porcentaje residual de plomo con la utilización de bacterias psicrófilas aplicadas en concentración de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg.L⁻¹ del metaloide.

Fuente: El Autor

En la figura 9 se identifica que el tratamiento P1 0.1 presentó un porcentaje de reducción del 94.50%, CM 0.1 del 94.70%, CM 0.2 del 96.20%, PH 0.1 del 96.43%, PH 0.2 del 97.12%, PA 0.2 del 98.68%, PH 0.4 del 99.53%. PA 0.4 del 99.62%, PH 0.8 del 99.70%, PA 0.8 del 99.72%, CM 0.4 del 99.73% y CM 0.8 del 99.78%, dejando como resultado; tras la realización del análisis estadístico, que el mejor tratamiento para la reducción de plomo es el que presenta bacterias psicrófilas obtenidas en el punto de muestreo CM, aplicadas bajo una concentración de 0.8 mg.L⁻¹ del metaloide.

Sin embargo los tratamientos expuestos presentaron la capacidad de reducir más del 94% de la concentración del Pb, pues las cepas bacterianas psicrófilas pertenecientes al phylum *Firmicutes* demostraron una capacidad de reducción de dicho metaloide, incluso en una concetración del 80% más que el limite permisible para el cuerpo humano.

Los microorganismos aplicados en la reducción de metales pesados son considerados como biosorbentes, estos presentan la capacidad de crecimiento, remoción, detoxificación en medios con acumulación de plomo; e incluso permiten la recuperación del metaloide,

presentando un rango del 50 al 98% de remoción dependiendo de las concentraciones de dicho metal (Pérez et al., 2015).

La biosorción es un mecanismo por el cual se realiza una captación de iones metálicos mediante la utilización, en la mayoría de los casos, de biomasa microbiana, dónde se reutiliza residuos originarios de varios procesos. Esto permite la acumulación de varios contaminantes con gran relevancia en el medio (Vera, 2015).

El pH es un parámetro que se relaciona directamente con la biosorción, pues interfiere en el proceso de sorción, afectando la solubilidad de los metales y a la vez la activación de los grupos funcionales de la biomasa. De esta forma la interacción de los cationes metálicos con la biomasa, es muy sensible a los valores del pH (Naranjo et al., 2012). Así, cuando la solución se vuelve eléctricamente neutra, el pH es estimado como el punto isoeléctrico, dónde la solubilidad de iones metálicos es baja cuando el valor de pH está en un rango alcalino (Tejada et al., 2014).

El pH en el cual se realiza una mayor absorción de los metales es cuando se encuentra en un rango de acidez, esto permite encontrar con mayor disponibilidad grupos carboxílicos en forma aniónica (Borja et al., 2015).

Lavado Y Oré. (2016), determinaron las condiciones óptimas para la biosorción del plomo relacionadas con el pH, dónde establecieron un rango de 2 a 6, evidenciando una reducción del 40% de dicho metaloide a un pH de 5.5.

Soto, Calderón, Flores, Solís, Y Dávalos. (2016), aplicaron bacterias Gram positivas y Gram negativas para la remoción de plomo, donde identificaron que las bacterias Gram positivas redujeron hasta un 56.25% de la concentración de plomo y resistieron a una concentración de 1200 ppm, de esta manera establecieron que dichas bacterias pueden ser utilizadas como agentes biológicos en procesos de biorremediación en altas concentraciones.

Herrera. (2014) investigó la capacidad biorremediadora de bacterias pertenecientes al grupo bacteriano *Proteocabérias* y *Firmicutes*, en un medio enriquecido de plomo, donde determinó que las bacterias del grupo *Firmicutes* presentaron una reducción significativa del metaloide en un 27%, concluyendo que este tipo de cepas bacterianas tienen la capacidad de tolerar altas concentraciones de plomo, confiriéndoles un carácter como potencial biorremediador.

De esta manera, tomando como referencia lo antes mencionado y relacionando con los estudios realizados en base a la reducción de plomo mediante la aplicación de agentes microbianos, se determina que las cepas utilizadas en la presente investigación poseen un carácter biosorbente y pueden ser aplicadas en procesos de biorremediación, especialmente aquellas proveniente del punto CM, pues el pH característico de dicha ubicación permitió que la acción de biosorción sea eficiente, soportando 8 veces el límite máximo permisible del metaloide.

Tabla 7.

Secuencias relativas

Banda	Secuencia relativa cercana	Grupo bacteriano	Longitud de ADN	Gen Bank no. acceso
3	<i>Carnobacterium divergens</i>	Firmicutes	1481BP	NR_113798.1
4	<i>Carnobacterium funditum</i>	Firmicutes	1484 bp	NR_113773.1
4	<i>Carnobacterium iners</i>	Firmicutes	1512 bp	NR_108864.1
4	<i>Carnobacterium funditum</i>	Firmicutes	1521 bp	NR_025946.1
5	<i>Carnobacterium funditum</i>	Firmicutes	1484 bp	NR_113773.1
5	<i>Carnobacterium iners</i>	Firmicutes	1512 bp	NR_108864.1
6	<i>Carnobacterium divergens</i>	Firmicutes	1481 bp	NR_113798.1
7	<i>Carnobacterium funditum</i>	Firmicutes	1484 bp	NR_113773.1

Fuente: El Autor

La tabla 7 nos muestra la clasificación taxonómica a la que pertenece la familia Phylum Firmicutes, clase Bacillo, orden Lactobacillales, familia Carnobacteriaceae, género Carnobacterium.

Las bacterias Firmicutes son bacterias gram positivas de bajo contenido en CG, característica que las diferencia de las demás bacterias. Se trata de un grupo muy diverso, ubicuo y especialmente relevante en suelos y ambientes anaerobios.

La cubierta celular típica de Firmicutes consiste de una capa de peptidoglucano, cual es un polímero de proteínas y carbohidratos que dan la estructura y forma a la célula y también protege la bacteria de estreses osmóticos. Debajo del peptidoglucano, hay una bicapa fosfolípido y sus proteínas asociadas que funcionan como una barrera selectiva. Muchos miembros de los Firmicutes tienen una membrana exterior de proteína, llamada la capa S. La función de la capa S no es conocida pero se cree de impedir la depredación en el ambiente. (Heiman, 2018)

Este filo se divide en tres clases: bacilli, clostridia y Mollicutes, tienen una gruesa pared celular. Para sobrevivir, las bacterias Firmicutes que habitan en las profundidades no necesitan de la luz solar, como la mayoría de los organismos, sino de la radiación de uranio. La radiación que emana este mineral cercano a las fracturas donde viven tan raras bacterias, hace que se forme gas de hidrógeno de la descomposición del agua y sulfato de la descomposición del azufre. Resulta que el gas de hidrógeno es altamente energético al reaccionar con el oxígeno o con otros oxidantes como el sulfato. Las firmicutes almacenan esta energía y le permiten a otros microorganismos que viven en estas fracturas usar los residuos químicos de este proceso como alimento. Los expertos deben seguir investigando más sobre el proceso evolutivo que llevó a las firmicutes, bacterias que se alimentan de la radiación, a vivir en las profundidades terrestres y a desarrollar tan exóticas adaptaciones. (Lelyen, 2018)

6.5 Socialización

La socialización se realizó en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede – Ibarra, el día 23 de enero del 2019 a las 10:00h. Se realizó en las aulas de la PUCESI y se contó con la presencia de 10 estudiantes y 3 Ingenieros de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede – Ibarra.

Se dio a conocer la investigación realizada mediante una presentación en la cual se expuso los resultados obtenidos y los datos con mayor relevancia, se realizó una encuesta a los asistentes y se obtuvo los siguientes resultados:

La figura 10 nos indica que el sitio donde se realizó la socialización brindó las comodidades respectivas a los oyentes dando un porcentaje de alto y muy alto.

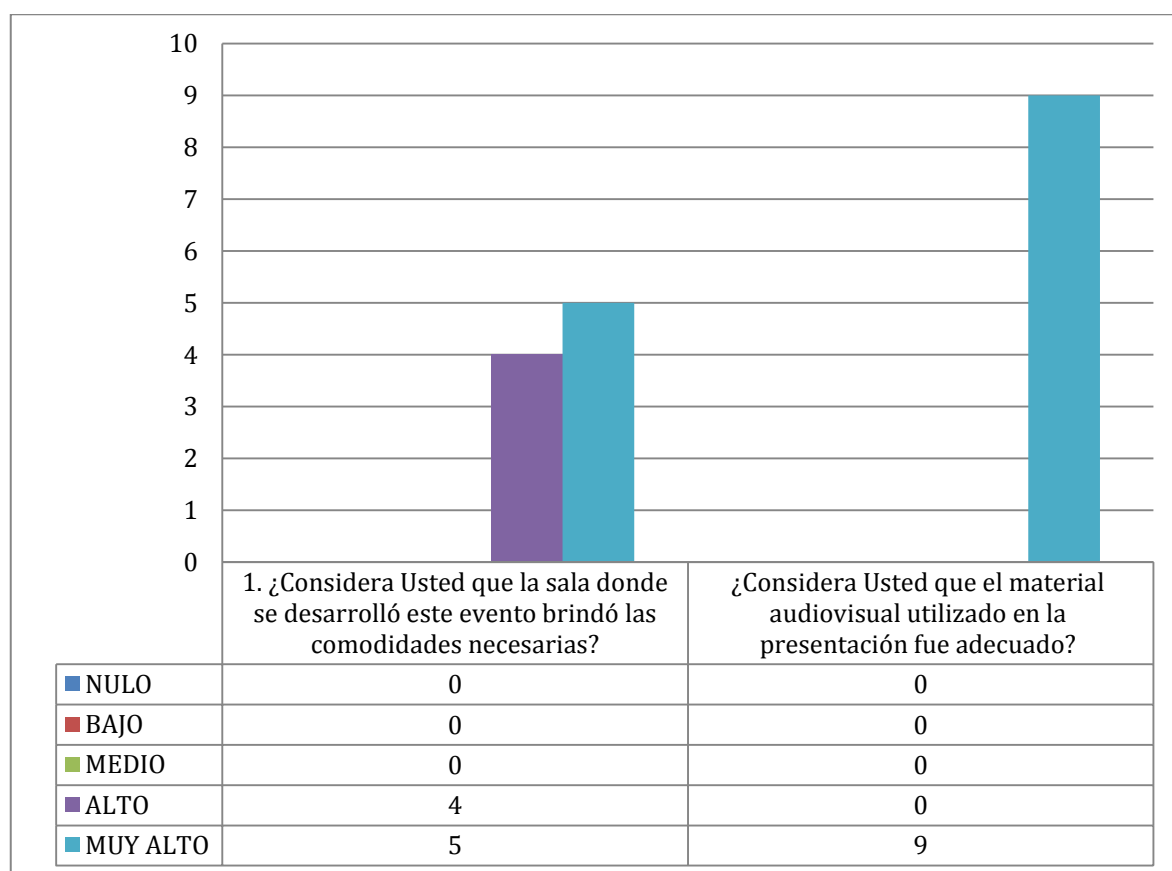


Figura 10. Tabulación de la organización del evento
Fuente: El Autor

La figura 11 nos muestra que el dominio por parte del expositor fue alto y muy alto, el desenvolvimiento en el auditorio por parte del expositor fue alto y muy alto, y el resultado de la facilidad de expresión fue bueno, alto y muy alto.

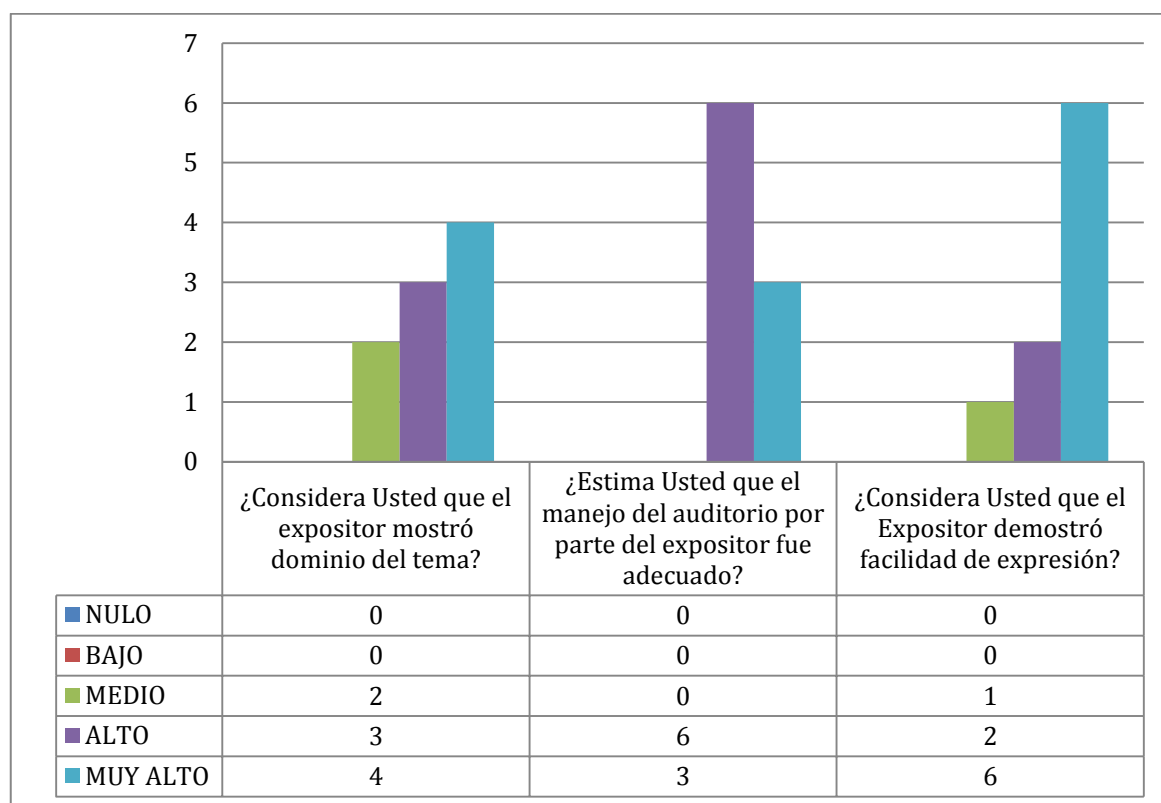


Figura 11. Tabulación de Ejecución del evento por parte del Expositor
Fuente: El Autor

La figura 12 demuestra que el tema investiga tiene relevancia para la sociedad con un valor de alto y muy alto, esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios nos dio un resultado de alto y muy alto, la importancia de este estudio para beneficio de comunidades fue de alto y muy alto, en función de los objetivos cumplidos tuvo un resultado de alto y muy alto.

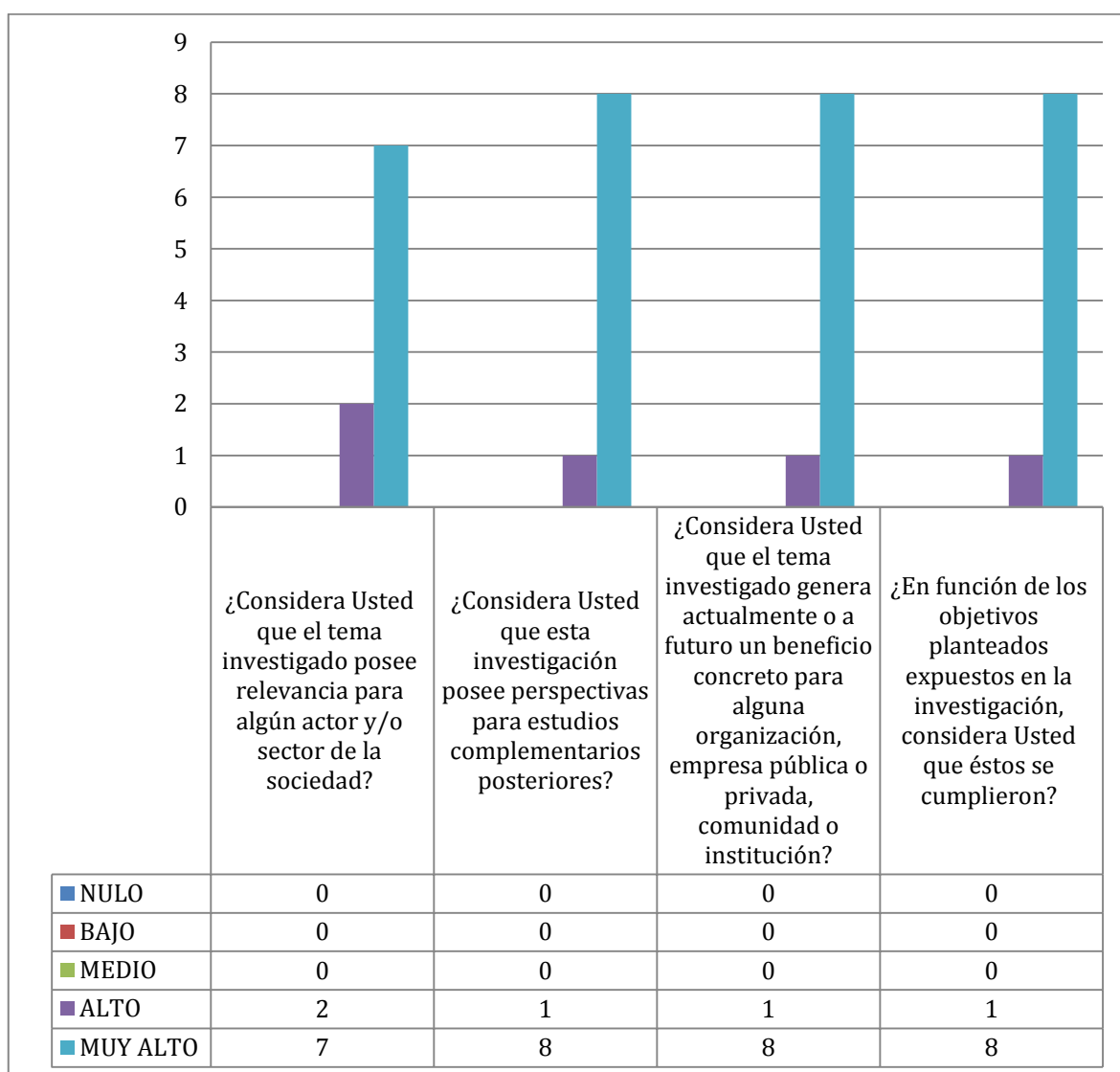


Figura 12. Tabulación de Medición de Impacto de la Investigación
Fuente: El Autor

7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

El análisis de pH indicó que los tres puntos de muestreo se encuentran en rangos neutros, cumpliendo con los parámetros máximos permisibles según el TULSMA, en cuanto el análisis de conductividad eléctrica demostró que las muestras obtenidas en los diferentes puntos establecidos; Punto Hielo (PH), Punto Agua (PA) y Cascada Mirlos (CM) se ubican dentro del rango establecido según la normativa de los estándares de calidad ambiental para la conservación de flora y fauna emitida por la constitución de Perú.

El aislamiento de cepas bacterianas determinó que la temperatura óptima para su desarrollo y crecimiento de bacterias psicrófilas fue a temperatura ambiente (19°C) y refrigeración (3°C).

El análisis de reducción de plomo según el punto de muestreo refleja que las bacterias más efectivas son del punto CM (Cascada Mirlos) con un porcentaje de reducción de 98.20 %, mientras que la concentración de Pb 0.08 ppm es la más efectiva con un porcentaje de reducción de 99.78%.

7.2 Recomendaciones

Desarrollar un estudio con bacterias psicrófilas con diferentes metales pesados para verificar la capacidad de biotransformación y resistencia con diferentes metaloides.

Efectuar más estudios con este género de bacterias ya que debido a sus características puede ser usado en diferentes áreas como la cosmetología, biosensores, industria de alimentos.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Aliaga, M. E. (2015). Morfología y estructura de las bacterias. Chile: Universidad Santo Tomás.
- Andreo, M. (2013). Demanda Biológica de Oxígeno. España: Alhambram.
- Angelova. (2004). Bioacumulación y distribución de metales pesados en fibra de cultivos. Bulgaria.
- Barrenechea, A. (2004). aspectos fisicoquímicos de la calidad del agua. Perú.
- Basaure, P. (2013). Microorganismos / Nutrición y Crecimiento. Chile.
- Blamey, J. (2008). Antártida: fuente de recursos biológicos para la biotecnología. Chile .
- Borja, N., García, V., Yipmantin, A., Guzmán, E., y Maldonado, H. (2015). Estudio de la Cinética de Biosorción de Plomo (II) en Alga *Ascophyllum Nodosum*. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v81n3/a03v81n3.pdf>
- Bujan, D. (2014). Análisis de agua. Colombia: Universidad Politécnica de Cartagena.
- Burt, R. (2003). Detección y vigilancia del cáncer colorrectal: pautas clínicas y justificación: actualización basada en nuevas pruebas. Canadá.
- Capdevielle, F. (2012). Un enfoque bioinformático para integrar información ambiental, bioquímica y genómica. Uruguay.
- Carbajal, Á. (2012). Propiedades y Funciones biológicas del Agua. España: Universidad Complutense de Madrid.
- Castrillón, O., Bedoya, O., & Montoya, D. (2006). Effect of pH on the growth of microorganisms during the maturation stage in static compost piles. Obtenido de http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/512/1/pl_v1n2_87-98_compost.pdf
- Chavez, A. (2007). Técnicas in vitro para la biorremediación de cromo y plomo. Costa Rica.
- Chiroque, T. (2014). Aislamiento e Identificación Bioquímica de *Carnobacterium maltaromaticum* en Truchas Arcoiris de Cultivo en el Departamento de Junín. Obtenido de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3941/Chiroque_lt.pdf?sequence=1
- Constitución Política del Perú. (2008). Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua. Obtenido de <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/per91588.pdf>

- Coto, A. (2013). Biotecnología y biorremediación. El Salvador.
- D'Amico, G. (2011). Indicadores de supervivencia. Italia: Universidad de Palermo.
- D'Amico, G. (2011). Indicadores de supervivencia. Italia: Universidad de Palermo.
- Dávila, M. (2012). Efectos antropogénicos provocados por los usuarios del agua en la microcuenca del río Pixquiac. México: Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.
- Dirzo, R. (2014). Factores de cambio y estado de la biodiversidad. México: CONABIO.
- EIB-PUCV. (2011). El Auge de las Enzimas de Psicrófilos en la Industria. Chile.
- Garzón, D. (2013). determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas. Ecuador.
- Garzón, D. (2013). Determinación de la Biodiversidad Bacteriana en Ecosistemas Glaciares de la Antártida. Obtenido de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3179/1/BQ37.pdf>
- Gerard, C. (2013). Enzimas psicrófilas. Bélgica: Universidad de Liége.
- Granada, C. A. (2014). Biotecnología de microorganismos extremófilos. Colombia: Universidad Católica de Manizales.
- Heiman, J. (2018). Bacteria de bajo GC Contenido y Gram Positivo. Estados Unidos.
- Hernández, M. A. (2014). Transformación de los sistemas naturales por actividades antropogénicas. México: CONABIO.
- Herrera, M. (2015). Contenido de arsenico en el agua potable del valle del Guadiana. México.
- Herrera, J. P. (2014). Aislamiento de Bacterias Resistentes al Plomo a partir de Suelos Contaminados con este Metal. Obtenido de http://www.conicit.go.cr/prensa/boletincyt/palabras_investigador/Palabras-JuanP-Herrera-Vargas.pdf
- Horikosh, K., & Bull, A. (2011). Extremophiles Handbook. Reino Unido.
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. (2006). Conductividad Eléctrica del Agua . Obtenido de <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Conductividad+El%C3%A9ctrica.pdf/f25e2275-39b2-4381-8a35-97c23d7e8af4>
- Kubicek, C., & Karaffa, L. (2006). Ácidos orgánicos. Reino Unido.
- Kurihara, T., & Esaki, N. (2008). Estudios proteómicos de microorganismos psicrófilos. Alemania.
- Landa, F. D. (2012). Evaluación de los ecosistemas en México. México: CONABIO.

- Laursen BG., B. L. (2005). Departamento de Patobiología Veterinaria, Real Universidad Veterinaria y Agrícola. Dinamarca.
- Lelyen, R. (2018). Firmicutes bacterias que se alimentan de la radiación. España.
- Lima, K. (2018). Caracterización genética y metabólica de bacterias en ambientes fríos con actividad antropogénica. Ibarra, Ecuador.
- López, M., Gutiérrez, F., & Básica, C. (2014). Metales Pesados y Biorremediación. Cuba.
- Madigan, M. (2014). Biología de los microorganismos. España: Pearson Prentice Hall.
- MAE. (2008). Normas del Recurso Agua. Ecuador.
- Mafla, S. (2013). Biotransformación de lixiviado de suelo impactado con roxarsona por comunidades bacterianas de aguas subterráneas en condiciones anaeróbicas. Chile.
- Mantilla, G. (2014). Calidad de Agua Residual Tratada. México.
- Markesteijn, L. (2015). Efectos de las perturbaciones antropogénicas sobre la generación de los bosques. Panamá: Elti.
- Maya, E. (2014). Técnicas y métodos de investigación. México: Universidad Autónoma de México.
- Mejia, J., Solorzano, J., & Gomez, P. (2015). Analisis de agua superficiales de centro poblado de Marian destinadas para uso agricola. Perú.
- Metpally, R. (2010). Comparación y análisis. Brazil.
- Minambiente. (2010). parámetros específicos a monitorear en los vertimientos puntuales y valores límites máximos permisibles. Colombia.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador . (2017). Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente. Obtenido de <http://www.competencias.gob.ec/wp-content/uploads/2017/06/01NOR2003-TULSMA.pdf>
- Naranjo, A. (2012). Bioadsorción de plomo (II) por biomasa microbiana seca: Efecto pH. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543730010.pdf>
- Obando, D. C. (2013). Determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas glaciares de la Antártida. Ecuador: Universidad Técnica de Ambato.
- Orellana, J. (2012). Características del agua potable. Argentina: Universidad Tecnológica Nacional.
- Orruño, M., Kaberdin, V., & Arana, I. (2017). Estrategias de supervivencia de *Escherichia coli* y *Vibrio spp* .: contribución del fenotipo viable pero no cultivable a su resistencia al estrés y persistencia en ambientes adversos. España.

- Ortega, A. (2012). Análisis de riesgos naturales en la subcuenca del Río Blanco, desde su origen hasta la ciudad de Cayambe. Ecuador: Universidad San Francisco de Quito.
- Pares, R., & Juárez, A. (2002). Bioquímica de los Microorganismos. España.
- Pastuzo, J. D. (2013). Estudio polifásico de bacterias psicrófilas colectadas en la isla Greenwich. Ecuador.
- Pérez, C. (2013). Tratamiento de agua. México: Universidad Autónoma de México.
- Pérez, M. (2013). Morfología de la estructura bacteriana. Bolivia: Revista de Actualización Clínica.
- Ramírez, D., Serrano, J., & Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. Venezuela.
- Ramírez, N. (2016). Microorganismos extremófilos. México: Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.
- Rodriguez, D., Ivanova, N., He, Z., Huebner, M., Zhou, J., & Tiedje, J. (2008.). Arquitectura de la adaptación térmica en una cepa de *Exiguobacterium sibiricum* aislada a partir de un permafrost de 3 millones de años: un enfoque de genoma y transcriptoma. Estados Unidos.
- Rojas, F. (2011). RojDetección molecular y fenotípica de proteínas CSP en bacterias psicrotolerantes, aisladas del territorio patagónico y antártico chilenos. Chile.
- Romero, G., & Chamorro, K. (2014). Evaluación de una planta de tratamiento de aguas residuales de una empresa de fabricación de quesos. Ecuador.
- Sánchez, C., Constanza, L., & Corrales, R. (2005). Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. Colombia.
- Sanchez, L. C. (2016). Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. Colombia: Universidad Colegio Mayor de Cudínamarca.
- Sepúlveda, T. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. México.
- Soto, M., Calderón, D., Flores, E., Solís, S., & Dávalos, C. (2016). Potencial de remoción de plomo mediante bacterias aisladas del sedimento de laguna San Juan, Ascensión, Chihuahua. Obtenido de http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v10n3/Data/Potencial_de_remocion_de_plomo_mediante_bacterias_aisladas_del_sedimento_de_laguna_San_Juan_Ascension_Chihuahua.pdf

- Superintendencia Nacional de Servicios y Saneamiento. (2010). Parámetros de Calidad y Límites Máximos Permisibles. Obtenido de <http://www.sunass.gob.pe/doc/normas%20legales/legisla%20web%28cambio%29/normas/calidad%20de%20agua/Oficio%20677.pdf>
- Valenzuela, L. C. (2014). La química del agua. México: Plaza y Valdés.
- Varela, G., & Grotiuz, G. (2008). Fisiología y Metabolismo Bacteriano. Uruguay.
- Vera, L. (2015). Biosorción, una alternativa para reducir la contaminación. Obtenido de <http://prometeo.educacionsuperior.gob.ec/biosorcion-una-alternativa-para-reducir-la-contaminacion/>
- Villalta, J. D. (2014). Estudio polifásico de bacterias psicrófilas. Ecuador: Universidad de Guayaquil.
- Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. México.
- Zuleta, C. (2017). Meteorología - Climatología. Fundamentos básicos. Alemania: Cuvillier Verlag Gottingen.
- Zúñiga, A. (2002). Producción continua de bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* a escala pre-piloto y estudio de su efecto antagónico en contra de *Listeria monocytogenes*. Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2002/faz.95p/doc/faz.95p.pdf>

9 ANEXOS

Anexo 1. Medición de pH



Fuente: El Autor

Anexo 2. Medición de Conductividad



Fuente: El Autor

Anexo 3. Aislamiento de Cepas Bacterianas



Fuente: El Autor

Anexo 4. Siembra de bacterias psicrófilas en caldo nutritivo LB a diferentes concentraciones



Fuente: El Autor

Anexo 5. Filtrado de muestras previo al análisis de absorción atómica



Fuente: El Autor

Anexo 6. Lista de asistentes de socialización

[illegible]

Fuente: El Autor

Anexo 7. Encuesta realizada a los asistentes



**Pontificia Universidad
Católica del Ecuador**

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

El siguiente cuestionario nos permitirá implementar mejoras constantes en los procesos de socialización de trabajo Investigación, por favor haganos llegar sus comentarios y sugerencias:

FECHA	23/01/2018		
EXPOSITOR	Alvaro Arango		
LUGAR	DENTRO PUCES	✓	FUERA PUCES

NOTA IMPORTANTE: Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:

5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

DETALLE DE VALORACIÓN	1	2	3	4	5
ORGANIZACIÓN DEL EVENTO DE SOCIALIZACIÓN					
1. ¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?				✓	
2. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?					✓
EJECUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR					
3. ¿Considera Usted que el expositor mostró dominio del tema?					✓
4. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?					✓
5. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?					✓
MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN					
6. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					✓
7. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?					✓
8. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futura un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?					✓
9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?					✓
REALICE UN COMENTARIO O SUGERENCIA PARA LOS ORGANIZADORES DE ESTE EVENTO					
MENCIONE USTED OTRAS PROBLEMÁTICAS QUE A SU PARECER PODRÍAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD					
Ninguna					
INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO					
PUCES					

Fuente: El Autor