



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA
DEL ECUADOR SEDE IBARRA
“PUCE-SI”**

**ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
“ECAA”**

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y METABÓLICA DE BACTERIAS EN
AMBIENTES FRÍOS CON ACTIVIDAD ANTROPOGÉNICA**

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN CIENCIAS
AMBIENTALES Y ECO-DESARROLLO**

Línea de Investigación 2. Ambiente y Biodiversidad
Sublínela 2.2 Evaluación de Impactos Ambientales

AUTORA: KARLA ALEXANDRA LIMA PAREDES

ASESOR: MSc. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

IBARRA, AGOSTO – 2018



CERTIFICACIÓN

Ibarra, 9 de agosto 2018

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

(1) 

M.Sc. 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)

M.Sc. Santiago Xavier Mafla Andrade

ASESOR DEL PROYECTO DE GRADO

C.C: 10026588399

(f)

Ph.D. Yadira Ordóñez

LECTORA DEL PROYECTO DE GRADO

C.C:1103764864

(f)

M.Sc. Diego Jáuregui

LECTOR DEL PROYECTO DE GRADO

C.C:1720282076



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Karla Alexandra Lima Paredes, 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 utilizaciones 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, 9 de agosto de 2018

(f) 

Karla Alexandra Lima Paredes

AUTORA DEL PROYECTO DE GRADO

C.C: 1003609912



AUTORÍA

Yo, Karla Alexandra Lima Paredes, portadora de la cédula de ciudadanía N° 1003609912, 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.

(f) 

Karla Alexandra Lima Paredes

AUTORA DEL PROYECTO DE GRADO

C.C: 1003609912



DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo Karla Alexandra Lima Paredes, con CC: 1003609912, autora del trabajo de grado intitulado: “Caracterización genética y metabólica de ambientes fríos con actividad antropogénica”, 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, 9 de agosto 2018

(f) 

Karla Alexandra Lima Paredes


C.C. 1003609912



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: "CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y METABÓLICA DE BACTERIAS EN AMBIENTES FRÍOS CON ACTIVIDAD ANTROPOGÉNICA", 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:


(f).....

Karla Alexandra Lima Paredes

C.I: 1003609912

Ingeniería en Ciencias Ambientales y Eco-desarrollo



DEDICATORIA

Esta investigación dedico a Dios, quien ha sabio guiarme en todo momento, ya que gracias a él he logrado culminar mi carrera, por mostrarme día a día que con humildad, paciencia, amor y esfuerzo todo es posible.

A mis padres quienes supieron estar conmigo brindándome su apoyo incondicional y comprensión en todo momento, son ellos quienes me enseñaron que nunca hay que darse por vencido y que para conseguir el éxito se necesita de un esfuerzo diario.

A mi hermano por estar ahí siempre para mí, escuchándome y dándome consejos para ser una mejor persona.

KARLA ALEXANDRA LIMA PAREDES



AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a Dios, quien me dio la vida y me ha llenado de bendiciones y felicidad, a él que con su infinito amor me ha dado la sabiduría para culminar mi carrera universitaria, y guiarme cada paso que doy.

A mis padres Sandra Paredes y Carlos Lima, quienes han estado a lo largo de mi vida apoyándome en todo momento y son el incentivo para salir adelante, esta tesis es por ustedes y para ustedes.

A Jonathan y Mauricio por estar presentes en cada momento de mi vida apoyándome, gracias por ser esas personas que llenan mi vida de amor y felicidad, gracia por acompañarme y estar presentes en la culminación de mi tesis.

A mi asesor de tesis, M.Sc Santiago Mafla quien con sus conocimientos, apoyo y esfuerzo supo asesorarme y guiarme a lo largo de esta investigación.

A mis profesores que de una u otra forma me ayudaron a crecer como persona y como profesional.

KARLA ALEXANDRA LIMA PAREDES

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.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
1 RESUMEN.....	14
2 ABSTRACT	15
3 INTRODUCCIÓN.....	16
3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3.2 JUSTIFICACIÓN.....	18
3.3 OBJETIVOS	18
3.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	18
3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3.4 HIPÓTESIS.....	19
4 ESTADO DEL ARTE.....	20
4.1 Bacteria psicrófilas	20
4.1.1 Membrana Celular.....	20
4.1.2 Aplicaciones de enzimas de psicrófilos en la industria.....	21
4.1.3 Adaptaciones de las bacterias psicrófilas a bajas temperaturas.....	22

4.1.4	Importancia de psicrófilos como productores de interés biotecnológico.....	22
4.1.4.1	Bacterias psicrófilas para de desarrollo biotecnológico.....	23
4.2	Características Físicas de las muestras de agua.....	24
4.2.1	Potencial de Hidrógeno.....	24
4.2.2	Demanda Química de Oxígeno.....	25
4.2.3	Sólidos Totales.....	25
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1	Diseño Experimental.....	26
5.2	Toma de Muestras.....	26
5.3	Caracterización Física del Agua.....	27
5.3.1	Potencial de Hidrógeno.....	27
5.3.2	Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	27
5.3.3	Sólidos Totales.....	28
5.4	Caracterización Molecular y Genética.....	28
5.4.1	Crecimiento de Microorganismo.....	28
5.4.2	Extracción de ADN.....	28
Lisado de Bacterias.....	29	
Unión de ADN.....	29	
Lavado de ADN.....	30	
Elución de ADN.....	30	
5.4.3	Amplificación del gen ADNr 16s.....	30
5.4.4	Análisis de Electroforesis con Gradiente de Desnaturalización (DGGE).....	31
Preparación de la Gradiente Desnaturalizante.....	31	
Proceso de tinción o separación de Unidades Operacionales Taxonómicas (OTU's).....	32	
5.5	Caracterización Metabólica.....	32
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1	Determinación de las zonas con actividad antropogénica.....	34
6.2	Caracterización física de las muestras de agua.....	35
6.2.1	Potencial de Hidrógeno.....	35
6.2.2	Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	37
6.2.3	Sólidos Totales.....	39
6.3	Análisis molecular de las comunidades bacterianas.....	40

6.3.1	Caracterización molecular.....	40
	Índices de Shannon (H').....	45
6.4	Análisis de la caracterización metabólica (EcoPlate™).....	46
6.4.1	Caracterización Metabólica en Invierno y Verano.....	47
6.5	Socialización.....	49
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53
7.1	Conclusiones.....	53
7.2	Recomendaciones.....	54
8	BIBLIOGRAFÍA.....	55
9	ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1: <i>Preparación Solución Madre de Desnaturalizante</i>	31
Tabla 2: <i>Puntos de Referencia</i>	35
Tabla 3 : <i>Parámetros Químicos: pH [H₃O]⁺</i>	35
Tabla 4: <i>Parámetros Químicos: DQO (mg/l)</i>	37
Tabla 5: <i>Parámetros Químicos: Sólidos Totales (mg/l)</i>	39
Tabla 6 <i>Secuencias relativas del análisis DGGE</i>	41
Tabla 7 <i>Índices de Diversidad Ecológica</i>	46

ÍNDICE DE FIGURAS.

<i>Figura 1</i> Recolección de muestras.....	26
<i>Figura 2:</i> PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®)	29
<i>Figura 3</i> Identificación de puntos de muestreo en zonas antropogénicas	34
<i>Figura 4</i> Muestras pH [H ₃ O] ⁺	36
<i>Figura 5:</i> Muestras DQO	37
<i>Figura 6:</i> Muestras de Sólidos Totales	39
<i>Figura 7:</i> Visualización de las bandas más representativas de gradiente de desnaturalización (DGGE) 20%-60% y separación de las OTU's más representativas.	41
<i>Figura 8</i> Análisis de similitud obtenidas mediante análisis del gen ARNr 16s por DGGE.....	43
<i>Figura 9</i> Escalamiento multidimensional obtenidas por el DGGE.	44
<i>Figura 10</i> Consumo de Fuentes de Carbono Complejo en Invierno y Verano.....	47
<i>Figura 11</i> Consumo de Ácidos Carboxílicos en Invierno y Verano	47
<i>Figura 12</i> Consumo de Aminas en Invierno y Verano	48
<i>Figura 13</i> Consumo de Carbohidratos en Inverno y Verano	49
<i>Figura 14:</i> Tabulación de la Organización del Evento	50
<i>Figura 15:</i> Tabulación de Ejecución del evento por parte del Expositor	51
<i>Figura 16:</i> Tabulación de Medición de Impacto de la Investigación.....	52

1 RESUMEN

La temperatura es un factor que determina el desarrollo, crecimiento y fisiología de los microorganismos, ya que afecta a sus funciones y a la célula, para adaptarse a nuevas condiciones, tal es el caso de las bacterias psicrófilas que crecen óptimamente en temperaturas de 0°C a 15°C. Los psicrófilos se han convertido en un importante recurso para la prospección biológica, debido a sus adaptaciones únicas al frío enzimáticas a bajas temperaturas.

La presente investigación tuvo como objetivo la caracterización molecular y metabólica de bacterias en ambientes fríos, para evaluar la variabilidad de especies, en lugares con mayor actividad antropogénica. Se realizó una extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis con gradiente de desnaturalización las bandas que presentaron en los geles fueron extraídas, purificadas, amplificadas y secuenciadas, dando como resultado la presencia de bacterias psicrófilas de género *Carnobacterium*, las cuales tienen un óptimo crecimiento y desarrollo en ambientes fríos. En el escalamiento multidimensional del patrón de bandeo se observó que todas las muestras tienen un 20% de similitud.

En cuanto a la caracterización metabólica de las comunidades bacterianas presentes se colocó en el kit de BIOLOG MicroPlate™, se obtuvo como resultado que se consumió el 80% de fuentes de carbono en seco y en húmeda se consumió el 20% de fuentes de carbono, cuando la respiración de las bacterias era mayor el colorante de tetrazolio Redox se tornaba de otro color como resultado de la respiración celular.

Palabras Clave: Psicrófilas, DGGE, PCR.

2 ABSTRACT

Temperature is a factor that determines the development, growth and physiology of microorganisms, since it affects their functions and the cell in order to adapt to new conditions, such is the case of psychrophilic bacteria that grow optimally in temperatures ranging from 0 ° C to 15 ° C. Psychrophiles have become an important resource for biological prospecting due to their unique adaptations to cold enzymes at low temperatures.

The objective of the present investigation was the molecular and metabolic characterization of bacteria in cold environments in order to evaluate the variability of species in places with greater anthropogenic activity. DNA extraction, polymerase chain reaction and electrophoresis with denaturation gradient were performed. The bands presented in the gels were extracted, purified, amplified and sequenced, resulting in the presence of psychrophilic bacteria of *Carnobacterium* genus, which have optimal growth and development in cold environments. In the multidimensional scaling of the banding pattern it was observed that all samples have 20% similarity.

As for the metabolic characterization of the bacterial communities present, it was placed in the BIOLOG MicroPlate TM kit, as a result of which 80% of carbon sources were consumed in summer and 20% of carbon sources were consumed in winter.

Key words: Psychrophiles, DGGE, PCR

3 INTRODUCCIÓN

Las bacterias se encuentran presentes en una gran diversidad de ambientes, en algunas ocasiones no cumplen con condiciones óptimas para el desarrollo de sus funciones, sin embargo, encontramos organismos microscópicos perfectamente adaptados. En los últimos años, la investigación de microorganismos que se desarrollan en ambientes extremos, tanto bacterias como hongos, es de gran interés por las características enzimáticas que estas poseen y que posiblemente aportan al desarrollo de la aplicación biotecnológica. (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, entre otros, son catalogados como extremófilos (aquellos organismo que viven en ambientes extremos), que 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)

En Cayambe existe gran cantidad de vertientes de agua, la mayoría de estas provienen del nevado, de ella nacen dos sistemas fluviales, el uno con dirección al Occidente y el otro con dirección al Oriente entre los ríos principales tenemos río Monjas, río Sayaro, río Guachalá, entre otros. Este nevado cuenta con una contribución muy importante para las comunidades de esta región. (Ortega, 2012)

En el nevado Cayambe se espera encontrar bacterias que sean capaces de crecer y reproducirse a bajas temperaturas, existen clases de bacterias que pueden vivir en ambientes extremos como los psicrófilos que crecen a temperaturas que oscilan en el rango de 0°C a 15°C y una temperatura máxima de desarrollo por debajo de los 20°C y su desarrollo es acelerado a temperaturas superiores a 25 °C. Estas bacterias poseen un metabolismo diferente a las demás, llevan a cabo sus funciones con normalidad a bajas temperaturas, producen enzimas 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. En este sentido en diversas bacterias antárticas se han detectado bacterias psicrófilas y psicrotolerantes. Estos microorganismos pueden ser utilizados en el futuro

para nuevos procesos microbiológicos más exactos, rápidos y amigables al medio ambiente. (Villalta, 2014)

El 1,66% de la población de Cayambe descarga sus aguas servidas por los ríos o vertientes que se encuentren cercanas, la mayoría de comunidades de este cantón consumen el agua sin tratar, por esta razón es importante la ayuda de microorganismos, las enzimas secretadas por las bacterias psicrófilas son las indicadas para aplicar procesos de biorremediación en lugares con bajas temperaturas y contaminación. La bioprospección juega un papel muy importante, ya que los microorganismos han tenido un crecimiento sostenido por los últimos años en ambientes distribuidos, por todo el mundo ya se han utilizado estos microorganismos para diferentes industrias y servicios ambientales, por ejemplo estas bacterias psicrófilas producen enzimas deshidrogenasas (elemento biológico que puedan ser una enzima, un anticuerpo o un ácido nucleico), son aplicadas a biosensores, otras enzimas permiten la remediación de ambientes contaminados. (Capdevielle, 2012)

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El principal problema de esta investigación es determinar la variabilidad de especies, que encontramos en el nevado Cayambe, las actividades antropogénicas son el principal problema por la destrucción de ecosistemas y hábitats, perdiendo el conjunto de especies que se desarrollan en un determinado lugar. El deterioro de los hábitats es la principal causa de pérdida de biodiversidad. La pérdida de hábitat sucede por el “cambio de uso del suelo” de ecosistemas naturales a actividades agrícolas, ganaderas, industriales, turísticas, entre otras, todas ellas contempladas en las evaluaciones de impacto ambiental de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente normas y reglamentos asociados.

Las capacidades científicas y el entorno regulatorio constituyen otra barrera de entrada debido a que los conocimientos y la experiencia requerida para trabajar con microorganismos y plantas de ambientes fríos no son triviales y requieren años para adquirirse. Además la obtención de recursos para fines biotecnológicos es costosa por esta razón dificultan el desarrollo biotecnológico. (Blamey, 2008)

3.2 JUSTIFICACIÓN

El Nevado Cayambe posee condiciones extremas en las cuales se desarrollan diversos microorganismos, que abren una gran oportunidad para investigaciones científicas como es el desarrollo de la microbiología.

Abre nuevas puertas, ya que se pueden encontrar poblaciones únicas de microorganismos capaces de producir nuevas sustancias como antibióticos de importancia y a aplicaciones en diversas áreas tales como producción de alimentos, minería, procesamiento de basura, biorremediación ambiental entre otros. (Garzón, 2013)

La bioprospección de este tipo de microorganismos ha tenido un crecimiento sostenido en los últimos años en ambientes distribuidos por 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)

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

- Caracterizar genética y metabólicamente las comunidades bacterianas presentes en muestras de agua de la zona del nevado Cayambe, mediante técnicas moleculares indicando el impacto causada por la actividad antropogénica.

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las zonas con actividad antropogénica, mediante georreferenciación, identificando los puntos principales de muestreo

- Caracterizar físicamente las muestras de agua, mediante técnicas de laboratorio, identificando la calidad de las mismas en cada zona.
- Identificar molecular y metabólicamente las comunidades bacterianas en cada uno de los habitat, mediante técnicas moleculares, demostrando la variabilidad de las mismas.
- Socializar los resultados mediante una charla informativa con los actores involucrados en el tema para dar a conocer la relevancia del estudio.

3.4 HIPÓTESIS

- **H₀:** Existe especialización de las comunidades bacterianas por la actividad humana.

Variables Dependientes: Número de Especies

Variables Independientes: Temperatura

4 ESTADO DEL ARTE

4.1 Bacteria psicrófilas

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 se desarrollan a temperaturas de 0°C a 15°C y una temperatura máxima de desarrollo por debajo de los 20°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. (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 Csp (vacuna que controlan la malaria CSP humana en fase III) de bajo peso molecular, consistente con la inducción de proteínas tipo Csp, realizado por Felipe Andrés Contreras Rojas, de la Universidad de Concepción, ubicada en Chile.

4.1.1 Membrana Celular

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 ésta es regulada positivamente a baja temperatura, ocasionando cambios químicos durante el transcurso de la reacción que produce las desaturasas. (Rodrigues, Ivanova, He, Huebner, Zhou, & Tiedje, 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).

La Universidad de Barcelona y la Universidad de Veracruz conjuntamente con el Instituto Tecnológico de Veracruz, determinaron que estos microorganismos son de gran importancia para aplicación a gran escala, como fuente de biomoléculas con capacidad biocatalizadora, capaces de soportar condiciones drásticas de proceso y cuyo uso comercial puede conducir a la

sustentabilidad industrial, lo que finalmente redundará en el beneficio de las generaciones presentes y futura.

4.1.2 Aplicaciones de enzimas de psicrófilos en la industria

La Pontificia Universidad Católica de Valparaíso; Laboratorio de Biocatálisis Enzimática en Chile determina (EIB-PUCV, 2011)

- La aplicación de enzimas provenientes de psicrófilos, se encuentra ampliamente extendida en la industria y abarca rubros tan diversos como: la industria textil, alimentaria, láctea, cervecera, del vino y lavandería. Lipasas, proteasas, celulasas y amilasas provenientes de microorganismos psicrófilos son empleadas como agente activo en los detergentes para lavado en frío. Esto reduce el consumo de energía y evita el desgaste de las fibras textiles.
- Otra aplicación de estas enzimas, se encuentra en el depilado industrial de pieles y cueros donde se emplea una proteasa denominada queratinas, la cual permite un ahorro de energía térmica y reducir los efectos indeseables de los productos químicos. Otras aplicaciones potenciales de las enzimas provenientes de psicrófilos, se encuentran en procesos tales como la hidrólisis de la lactosa en la leche utilizando galactosidasa, en el biopulido de productos textiles usando celulasas, en extracción y clarificación de jugos de frutas usando pectinadas, en el ablandamiento de la carne o la mejora de su sabor mediante el uso proteasas, en el mejoramiento de las cualidades organolépticas de productos de panadería empleando amilasas, proteasas y xilanasas, en el ablandamiento de lana o en la limpieza de lentes de contacto empleando proteasas.
- En general, el uso de enzimas psicrófilos se perfila como una alternativa interesante cuando el empleo de temperaturas moderadas o altas puede afectar negativamente la calidad del producto. Además, estas enzimas permiten un ahorro importante de energía térmica y como el resto de las enzimas, son ecológicamente más favorables que otras formas de producción. Sin embargo, poseen la desventaja de ser muy termolábiles. No obstante, este último aspecto puede ser mejorado a través de técnicas de inmovilización enzimática las cuales además, permiten el reusó del catalizador.

4.1.3 Adaptaciones de las bacterias psicrófilas a bajas temperaturas

De acuerdo a D'Amico, G. con su investigación de Indicadores de supervivencia realizado en Italia determina (D'Amico G. , 2011)

- Entre las principales adaptaciones de las bacterias psicrófilas se encuentra la reducción de la actividad enzimática, disminución de la fluidez de la membrana, disminución de la transcripción, traducción y la división celular, desnaturalización de enzimas y formación de hielo intracelular.
- La disminución de la temperatura tiene un efecto adverso en las propiedades físicas y en la función de las membranas. Por lo general, conduce a una reducción de la fluidez de la misma y en última instancia conlleva a una pérdida de la función. La composición de lípidos gobierna las propiedades físicas de las membranas y por lo tanto no es sorprendente que esto cambie con el hábitat térmico del microorganismo. Diversos estudios sobre la composición de las membranas de los psicrófilos, han puesto de manifiesto que tienen un mayor contenido en ácidos grasos insaturados, poliinsaturados y metil-ramificados, lo que facilita el estado semifluido de las membranas a bajas temperaturas.

Estos microorganismos presentan éxitos evolutivos, adquiriendo nuevos procesos de supervivencia y adaptación muy alta en relación a las bacterias de hoy, también, poseen diferentes membranas celulares de acuerdo a las condiciones en que se encuentran y desarrollaron funciones de adaptación al medio cambiando sus funciones metabólicas, físicas y químicas para poder cumplir con sus funciones vitales tales como alimentación, reproducción, se desplazan y responden a los estímulos del ambiente. (Madigan, 2014)

Las bacterias psicrófilas producen enzimas que con frecuencia se desnaturalizan o se inactivan incluso a temperaturas muy moderadas. (Gerard, 2013).

4.1.4 Importancia de psicrófilos como productores de interés biotecnológico

Algunas de las bacterias psicrófilas pueden formar omega-3 (ácidos grasos insaturados) de importancia dietética y pueden representar una fuente alimenticia de bajo costo, esta aplicación ha sido investigada recientemente por la industria. (Castillo, Róldan, & Blasco, 2005)

Los océanos, cuyas temperaturas medias oscilan entre los 5°C, representan más de la mitad de la superficie terrestre, la temperatura de las profundidades marinas va desde 1-3°C, sin embargo, a pesar de estas condiciones extremas, estos ambientes fríos raramente son estériles y se encuentran microorganismos creciendo en estas superficies. En el Ártico, en la Antártida, nevados, entre otros, permanecen congelados, o se descongelan a lo largo del año, en estos ambientes se encuentran microorganismos vivos posiblemente con nuevas vías metabólicas, capaces de desarrollar nuevas sustancias de uso biotecnológico. (Madigan, 2014)

En las zonas donde se puede realizar investigaciones para el crecimiento del desarrollo biotecnológico debe realizarse en lugares que permanezcan congelados la mayor parte del año, las condiciones de aislamiento y bajas temperaturas, de la Antártica alberga un potencial científico y biotecnológico enorme, pero también tiene barreras de entrada de diferente índole para los investigadores. Estos problemas retrasan los estudios en el campo de la microbiología y por lo tanto el desarrollo biotecnológico también se ve afectado. (Blamey, 2008)

En la actualidad existen varios estudios sobre la importancia de bacterias psicrófilas, ya que tienen un gran potencial para el desarrollo biotecnológico.

4.1.4.1 Bacterias psicrófilas para de desarrollo biotecnológico

Las bacterias psicrófilas poseen un importante reservorio de moléculas de interés industrial y con aplicaciones biotecnológicas novedosas. Las enzimas de dichas bacterias tienen una alta eficiencia catalítica por debajo de los 40°C y se asocian a menudo, o casi siempre, con una alta termosensibilidad. Una de las enzimas más importantes producida por estas bacterias es la enzima lipasa estas son biocatalizadoras más versátiles, el uso de estas enzimas es de gran influencia en el mercado ya que aportan con diversas aplicaciones como síntesis de biopolímeros y biodiesel fabricación de productos farmacéuticos, agroquímicos, cosméticos y sabores. Las lipasas activas en frío están presentes en muchos microorganismos que sobreviven a temperaturas alrededor de 5°C, una cantidad escasa de bacterias y levaduras han sido utilizadas para la producción industrial. (Metpally, 2010)

Investigaciones recientes indican que las bacterias psicrófilas, poseen diferentes aplicaciones industriales, una de las últimas investigaciones se realizó en el 2011 en la Universidad de Palermo Italia.

4.2 Características Físicas de las muestras de agua

El agua es una sustancia importante para la vida con excelentes propiedades, es considerada como un compuesto simple, sin embargo, el ser humano tiene la necesidad constante de este fluido para realizar funciones vitales como cocinar, higiene, usos domésticos e incluso industria y energía. Todos los seres que habitan el planeta son mayoritariamente agua y realizan la totalidad de las reacciones químicas en un medio acuoso, desde el transporte de nutrientes, pasando por el metabolismo hasta la excreción de sustancias se realizan a través del agua. (Carbajal, 2012)

El agua es una molécula sencilla formada por átomos pequeños, dos de hidrógeno y uno de oxígeno que unidos por enlaces covalentes muy fuertes hacen que dicha molécula sea estable. Este enlace confiere al agua más propiedades, de ahí sobresale el elevado punto de fusión y ebullición, indispensables para que este compuesto siempre esté en estado líquido a temperatura ambiente. (Valenzuela, 2014)

4.2.1 Potencial de Hidrógeno

Es una variable que tiene aplicaciones variadas en el campo de las aguas naturales y residuales, en caso de que el pH tenga valores extremos puede originar la muerte, alteraciones de flora y fauna e incluso, reacciones negativas como cambios en la solubilidad de nutrientes o formación de precipitados, para la mayoría de los microorganismos el pH favorable esta entre 6.0 y 7.2. Si los rangos están fuera de estos límites se produce la desnaturalización de las proteínas y no es posible la vida. (Bujan, 2014)

La alcalinidad tiende a elevar el pH en el agua por encima de cierto valor, mientras que la acidez corresponde al descenso del mismo. En conjunto, ambos controlan la capacidad de neutralizar variaciones de pH provocadas por la adición de bases o ácidos, a este proceso también se le conoce como taponamiento. (Orellana, 2012)

Análisis de agua es de gran importancia para determinar el grado acides o basicidad, una de las investigaciones más recientes se realizó en el 2014 por Bujan.

4.2.2 Demanda Química de Oxígeno

La demanda química de oxígeno o DQO, es la cantidad de oxígeno consumido por los cuerpos reductores presentes en el agua sin la intervención de organismos vivos, determina el contenido total de materia orgánica oxidable sin importar que sea biodegradable o no. (Pérez, 2013).

El DQO indica la intervención de organismos vivos, en el 2013 Claudia Pérez escribió sobre tratamiento de agua, para la recuperación de la misma.

4.2.3 Sólidos Totales

Son todos los elementos y compuestos presentes en el agua que no entren en la categoría de gases. Los sólidos pueden ser materiales suspendidos o disueltos en agua limpia y residual, por lo general, el término “sólidos totales” se utiliza para representar a todos los residuos materiales que quedan en un recipiente luego de la evaporación de la muestra. Cabe recalcar que la mayoría de contaminantes en el agua son sólidos. (Pérez, 2013)

Para tratar en agua se debe saber en qué estado de contaminación está, por esta razón Claudia Pérez indica algunos parámetros del agua tales como: pH, turbidez, DQO, DBO, entre otros.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño Experimental

El diseño experimental aplicado en esta investigación es “t” de student. Este diseño experimental, se utiliza cuando el muestreo es pequeño para que exista una distribución equitativa.

5.2 Toma de Muestras



Figura 1 Recolección de muestras.

Fuente: La autora

Por medio de una salida de campo se identificó los lugares con menor y mayor actividad antropogénica, por esta razón los puntos de muestreo se tomaron en diferentes lugares y estaciones del año tales como húmedo y seco, para determinar la variabilidad de especies, ya que las diferentes estaciones pueden alterar los hábitats de las especies en el Nevado Cayambe; con la ayuda de frasco de vidrio totalmente esterilizados en el autoclave a 121°C y 1.5 atm por 45 minutos se tomaron las respectivas muestras en los diferentes puntos; los puntos se marcaron con la ayuda de un GPS eXplorist 500 de MAGELLAN; el primer punto se tomó a una altitud 4680 msnm, a 5 cm de la capa de hielo donde no existían actividades antropogénicas; para el segundo punto se seleccionó una vertiente de agua que salía de Nevado con una altitud de 4120 msnm; el tercer punto fue tomado en la quebrada Turucucho con una altitud de 3880 msnm en la cual tenía

emanaciones de azufre; para el cuarto punto se tomó en cuenta un riachuelo con una altitud de 3660 msnm donde se evidenció fauna tanto silvestre como doméstica y plantaciones agrícolas y finalmente se tomó el quinto punto con una altitud 3400 msnm en la comunidad humana más cercana en donde se unían varios afluentes; seguidamente se transportaron las muestras en recipientes a una temperatura de 3°C al Laboratorio de Biotecnología de la Escuela ECAA de Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCE-SI). Además el muestreo se realizó en dos estaciones del año según Chavarrías dice que la temperatura es uno de los factores más determinantes que intervienen en la multiplicación microbiana, ya que la mayoría de los microorganismos crecen entre los 5 °C y los 65 °C. (Chavarrías, 2017)

5.3 Caracterización Física del Agua

La caracterización físico 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 que se encuentra en el nevado Cayambe. Los parámetros tomados en cuenta para esta caracterización son: pH, DQO y Solidos Totales.

5.3.1 Potencial de Hidrógeno

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 neutro; el análisis fue realizado con un potenciómetro ExStik® Modelo PH100. para medición en campo del fabricante EXTECH®.

5.3.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno es de gran importancia ya que nos permite verificar la cantidad de sustancias susceptibles a ser oxidados por medios químicos que se encuentran disueltas o suspendidas en una muestra líquida; para el análisis de este parámetro se utilizó un colorímetro LaMotte® SMART2, se tomó 2ml de las muestras y fueron colocados en tubos de ensayo con una solución digestora de Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$) y Ácido Sulfúrico (H_2SO_4), después se colocó en un termoreactor a una temperatura de 180°C por 3 horas. Finalizado el proceso de la digestión se procedió a la lectura de las mismas y su respectivo análisis.

5.3.3 Sólidos Totales

En el agua se puede encontrar cualquier variedad de impurezas ya sean suspendidas o disueltas, por esta razón es importante saber qué tipo de sustancias se encuentran las muestras de agua listas para su caracterización para el análisis de sólidos totales contenidos en los diferentes crisoles se procede a tarar crisoles ya calcinados, posteriormente, los crisoles fueron lavados con agua destilada y colocados a la estufa a una temperatura de 110°C durante 30 minutos, después se deja enfriar en decantador por 15 minutos para pesarlos en la balanza electrónica Nimbus de **aeADAM®**.

Con la ayuda de una pipeta, se colocó 20 ml de las muestras en los diferentes crisoles para la evaporación a sequedad durante 1 hora y 30 minutos a una temperatura de 110°C. Luego se procedió a medir el peso para determinar la cantidad de sólidos totales en cada una de las muestras.

5.4 Caracterización Molecular y Genética

5.4.1 Crecimiento de Microorganismo

El crecimiento de bacterias es necesario para verificar la cantidad de microorganismos presentes, es decir separar los posibles integrantes microbianos de la muestra; para el crecimiento de las bacterias tomadas, se inóculo 200 µl de cada muestra en tubos de ensayo que contenían 9 ml de caldo nutritivo (Nutrient Broth) de L.A.B fórmula estandarizada FDA/BAM (Administración de Alimentos y Medicamentos / Manual Analítico Bacteriológico.) y fue esterilizado en el autoclave a 121 °C y 1.5 atm por 45 minutos en el laboratorio de biotecnología de las PUCE-SI. Para la siembra en los tubos se hizo en medio estéril con la ayuda de un mechero, una vez realizada la siembra se cubrieron con algodón y fueron incubados por 48 horas en diferentes temperaturas a 4°C y 21°C.

5.4.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN es necesaria para verificar el código genético de las bacterias a ser evaluadas; para la extracción de ADN se usó el kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) el cual posee 7 reactivos los que son: Genomic Lysis/Binding Buffer, Genomic Digestión Buffer, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Genomic Elution Buffer, RNase A y

Proteinase K, estos reactivos son obligatorios para la extracción del ADN. En la figura 3 observa el kit utilizado.



Figura 2: PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®)
Fuente: Thermo Fisher Scientific

Lisado de Bacterias

Se agregó 1.5 ml del caldo bacteriano de cada una de las muestras en tubos de Eppendorf y se centrifugó a 10.000 revoluciones por minuto, varias veces obteniendo pellets. Se agregó 200 μ l de la solución compuesta Lysozyme Digestion Buffer solución compuesta por (Tris-HCL 25 mM, pH 8, 2,5 mM EDTA, Tritón X – 100 al 1%) con una concentración final de Liozina de 20 mg.mL^{-1}

La solución se agitó en el vórtex MIXER de LabNet (LabNet International, INC) durante 2 a 5 segundos, seguidamente se incubó las muestras a 37°C por 30 minutos, luego se agregó 20 μ l de Proteína K (proporcionado por kit), brevemente por agitación, se añadió 200 μ l Genomic Lysis/Binding Buffer (proporcionado por kit), se mezcló en el vortex, a continuación se incubó a 55°C durante 30 minutos concluido en tiempo de incubación se añadió 200 μ l de etanol (96-100%), al lisado se mezcló durante 5 segundos en el vortex hasta conseguir una mezcla homogénea.

Unión de ADN

Para la unión de ADN se transfirió 640 μ L del lisado previamente preparado con una columna giratoria con tubo de recogida (proporcionado por kit), y se centrifugó a una velocidad de 10.000 revoluciones por minuto. Luego, se retiró el tubo de recolección y se colocó el tubo con filtro en un nuevo tubo de recolección limpio de 2 ml (proporcionado por kit).

Lavado de ADN

Se colocó 500 µl de Wash Buffer 1 ml (proporcionado por kit) a la columna giratoria con el tubo de recolección y se centrifugó a 10.000 revoluciones por minuto, el tubo de recolección con flujo obtenido fue descartado y se colocó la columna giratoria en un nuevo tubo de recolección, seguidamente se añadió 500 µl de Wash Buffer 2 ml (proporcionado por kit) y se centrifugo a velocidad máxima por 3 minutos.

Elución de ADN

Se colocó la columna giratoria, en un tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 ml, se añadió 100 µl de Genomic Elution Buffer de kit, se incubó a temperatura ambiente, entre 1 minuto y se centrifugó a velocidad máxima por 1 minuto y medio, retirar la columna de filtro y tapar el tubo de microcentrifuga el cual contiene el ADN purificado contenido en el tubo Eppendorf, seguidamente se refrigeró a -30 °C.

5.4.3 Amplificación del gen ADNr 16s

Para la amplificación de gel se realizó el PCR o reacción en cadena de la polimerasa, se utilizó los patrones universales P2 (341f) y P3 (907r) para el dominio de bacterias, además se utilizan para estudios ecológicos.

El volumen utilizado fue de 25 µl para la realización del PCR, logrando así la concentración ideal de ADN de 10n molar/ µl, a continuación, se detalla los parámetros que se usaron para la amplificación del ADN, dichos parámetros se encuentran normados en el protocolo de Amplificación del gen ADNr 16s. Se usó agua libre de nucleasas (DNase, RNase) 5,5µl, partidores 907 (concentración 0,10µM) 1µl; P3 (341 a una concentración 0,10µM 1 µl; Taq Polimerasa 12,5µl y ADN 5µl. (Mafla, 2013)

La amplificación de ADN se realizó en el termociclador Multigene Optimax de LabNet. Las concentraciones que se usó para la amplificación comenzó con una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, luego se produjo un alineamiento a 55,6 °C por 45 segundos, continuo por una elongación a 72 °C por 90 segundos, después se dio un proceso de desnaturalización a 94 °C durante 30

segundos, con una alineación a 55,6 °C por 45 segundos y por último la extensión final a 72 °C por 90 segundos. (Mafla, 2013)

5.4.4 Análisis de Electroforesis con Gradiente de Desnaturalización (DGGE)

El DGGE es necesario para la separación de fragmentos amplificados en función de su secuencia nucleotídica; para esta técnica del DGGE o Electroforesis con gradiente de desnaturalización, se realizó en el equipo Cipher DGGEK-1001 (C.B.S Scientific Company®). Este equipo cuenta con una cámara vertical de electroforesis que cuenta con 18-20 litros de buffer TAE 1X (4° mM Tris-acetato y 1 mM EDTA, pH 8.3 a 25 °C). Se introduce el casete el cual se sumergido y bañado esta solución. (Scientific, 2017)

Preparación de la Gradiente Desnaturalizante

Para la preparación de la gradiente desnaturalizante (gel) se utilizaron tubos crónicos “Falcon” envueltos por papel aluminio para evitar la fotorreacción, se utilizaron 15 ml de soluciones al 20% y 60%. Para el proceso de polimerización de la acrilamida se preparó una solución de 500mg de Persulfuro de Amonio (Promega©) los cuales se disuelven en 500 µL de agua Mili-Q estéril, y se utiliza 150 µL y se también se agrega 15 µL de N – Tetra – metil-etilendiamina (TEMED) (SantaCruzBiotechnology©), en cada solución (20% y 60%). El vertical fue proporcionado por el fabricante del equipo Cipher DGGE-1001 (C.B.S Scientific Company®). (Scientific, 2017).

Tabla 1: *Preparación Solución Madre de Desnaturalizante.*

Porcentaje	20%	60%
40% Acrilamida Bis (mL)	18.8	18.8
50% TAE Buffer (mL)	2	2
Formamide (mL)	8	24
Urea g	8.4	25.2

Fuente: C.B.S Scientific Company®

La tabla 1 nos muestra cuales fueron los parámetros utilizados para la realización de los geles, para la ejecución de Electroforesis con gradiente de desnaturalización. Una vez preparado el gel se espera 1 hora para la solidificación del mismo, transcurrido el tiempo estimado, con una jeringa Hamilton®, se introduce 15µL de la amplificación del gen ADNr 16s (PCR) de los

partidores (907r-P3f), por lo que se extrae 12 μL de ADN y 3 μL de Buffer de carga Blue/Orange (6X Loading Dye Promega©) en una relación de 3:1. Por último, se lleva a cabo la electroforesis con las siguientes normas: con voltaje de 60 v (voltios), 500 A (Amperios) durante 720 minutos a una temperatura de 60 °C.

Proceso de tinción o separación de Unidades Operacionales Taxonómicas (OTU's)

Para la tinción del gel después de haber terminado dicho proceso mencionado anteriormente se utilizó 15 ml de solución TAE 1X y 3 μL de Diamond TM (Nucleic Acid Dye Promega©) en tubo crónico tipo "Falcon", con la ayuda de una jeringa quirúrgica totalmente estéril esparcir la mezcla con cuidado observando que no quede ningún lugar sin teñir y se deja reposar aproximadamente por 1 hora en la oscuridad.

Transcurrido el tiempo mencionado se procede a colocar dicho gel en un transiluminador UV LabNetTM Inc. para poder visualizar las bandas y separar la unidad taxonómica operacional (OTU's) más distintivo de las diferentes muestras. A continuación, se fotografió con una cámara digital SONY® DSC-HX400V de 20.4MP, obteniendo así un registro de las bandas más representativas y poder analizarlas en análisis informático.

Las bandas más distintivas fueron cortadas con la ayuda de un bisturí y se colocaron en tubos Eppendorf® de 1.5 ml, a los tubos se colocó 50 μL de agua mili-Q, después se realizó baño maría a 55 °C por 30 minutos, luego se procedió a centrifugar a 10000 revoluciones por 30 segundos finalmente las secuencias obtenidas fueron amplificadas.

5.5 Caracterización Metabólica

Para la caracterización metabólica de las comunidades microbianas presentes en las diferentes muestras, se utilizaron microplacas EcoPlate de Biolog, en cada placa contiene 31 pocillos con diferentes fuentes de carbono y un pocillo control sin fuente de carbono en cada pocillo mencionado anteriormente de colocó 200 μL de muestra. (Mafla, 2013)

Cada fuente de carbono tenía un tinte redox de Tetrazolium que se torna púrpura cuando es reducido por la respiración bacteriana. Dichas muestras se incubaron a 37 °C en un ambiente húmedo con agua destilada y se midió la densidad óptica de cada pocillo a $\lambda= 590$ nm durante

120 horas en intervalos de 24 horas usando un lector de micro placas MB-580-HEALES© máquina. (Mafla, 2013)

Por medio de este kit se pueden medir varios índices como: desarrollo de color en los pocillos de las micro placas (AWCD), índice de Shannon-Weaver (H') y el índice de riqueza (S) ($OD > 0,25$), estos índices fueron posteriormente analizados en el software GrandPad Prism 5®. (Mafla, 2013)

Las diferentes fuentes de carbono EcoPlate™ estuvieron divididas:

- Carbono
- Ácido carboxílicos
- Aminoácidos
- Polímeros
- Aminas

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación de las zonas con actividad antropogénica.

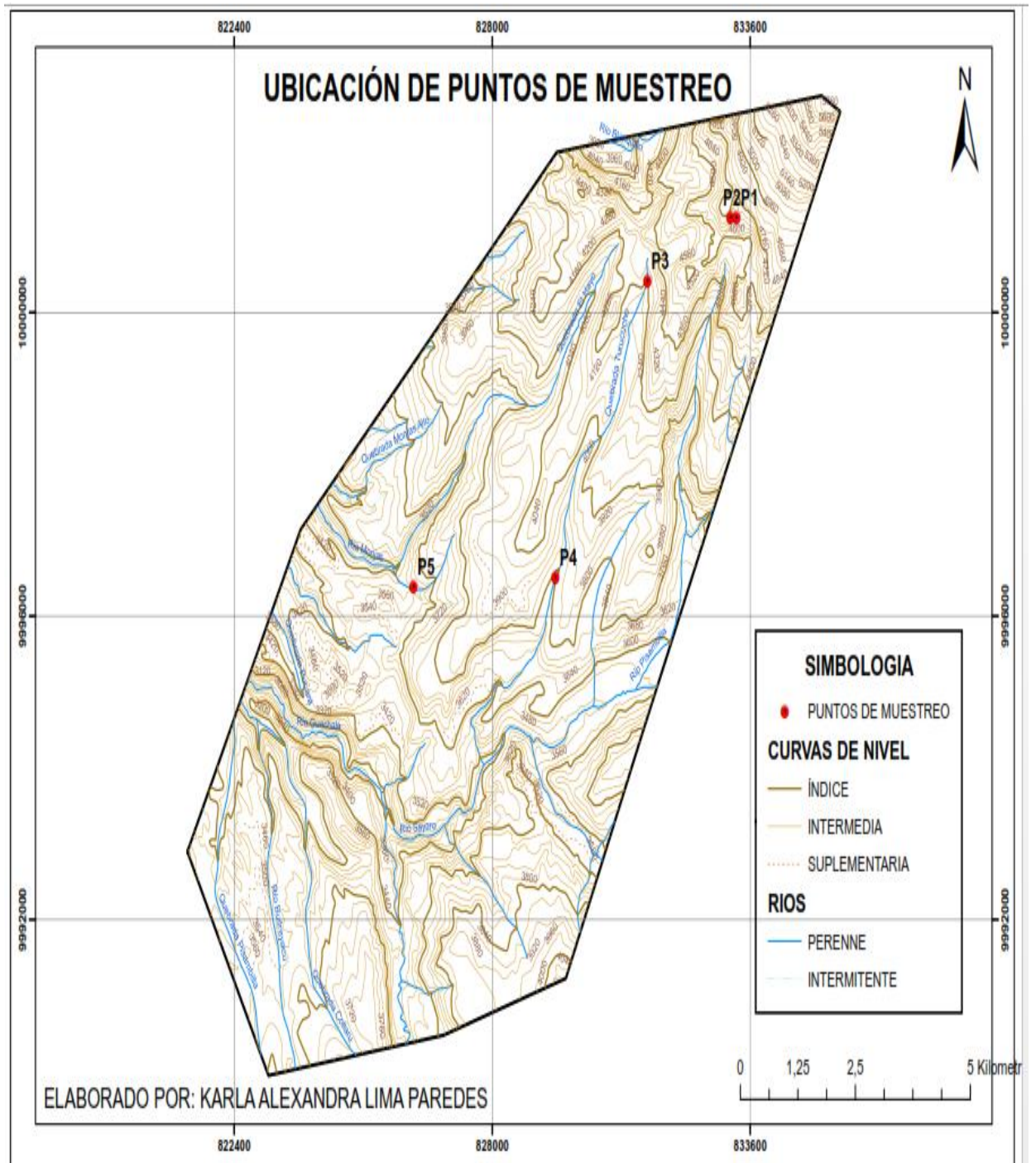


Figura 3 Identificación de puntos de muestreo en zonas antropogénicas
Fuente: La autora

Por medio de una salida de campo se reconocieron los diferentes ríos que posee este nevado, se evidencio puntos que tenían mayor y menor actividad antropogénica, con la ayuda del GPS, se marcó los diferentes puntos para luego realizar la georreferenciación. Los puntos se mencionan a continuación:

Tabla 2: *Puntos de Referencia.*

Referencia	Código
Punto Hielo	PH
Punto Agua	PA
Punto Quebrada	PQ
Punto Riachuelo	PR
Agua Sucia	AS
Lluvioso	LI
Seco	S

Fuente: La autora

6.2 Caracterización física de las muestras de agua.

Para la caracterización y evaluación físico química de la calidad de aguas, se tomó en cuenta los parámetros permisibles expuestos en la Tabla 3 (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) del Libro VI del Anexo I que hace referencia a las Normas del Recurso Agua incluido en el Texto Unificado de Legislación Secundaria Medio Ambiente (TULSMA).

6.2.1 Potencial de Hidrógeno

Tabla 3 : *Parámetros Químicos: pH [H3O]⁺*

MUESTRAS	INVIERNO ABRIL 2017	VERANO AGOSTO 2017
PH	7,1	7,1
PA	7,4	7,2
PQ	6,6	8
PR	6,5	6
AS	6,6	5,2
*TULSMA LIBRO VI ANEXO I	6.5 - 9	

*NOTA: FUENTE TULSMA LIBRO VI ANEXO I

Fuente: La autora

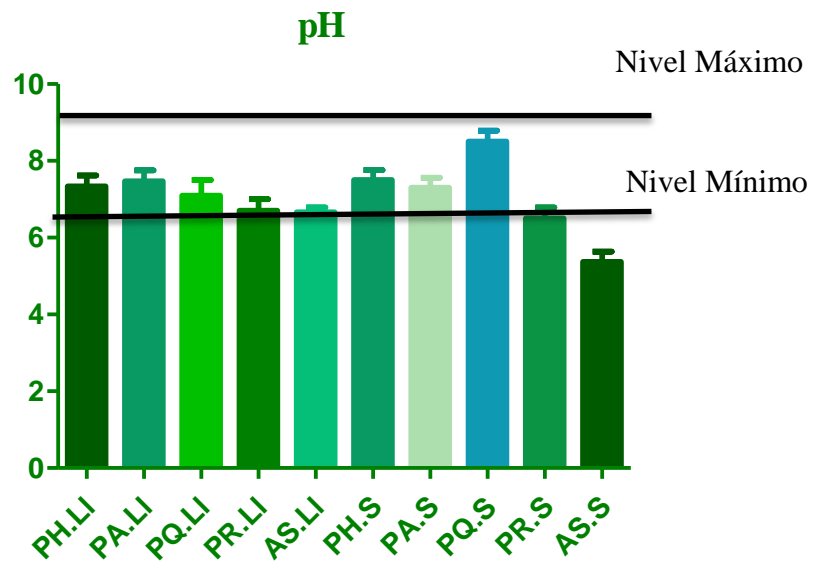


Figura 4 Muestras pH [H₃O]⁺
Fuente: La autora

En la figura 4 se observa que el resultado del análisis de pH de las muestras es variable, en los puntos PH.LI, PA.LI, PQ.LI, PR.LI AS.LI, PH.S, PA.S y PQ.S están dentro de los parámetros máximos permisibles de acuerdo con el Texto Unificado de Legislación Secundaria Medio Ambiente VI Anexo 1 tabla 3 (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.) Los puntos PR.V (6.00), AS.V (5,2) no se encuentran dentro del rango permisible.

En el lugar de muestreo PR.S se observó la presencia de animales tanto silvestres como domésticos (bovinos), es uno de los factores que está afectando la fauna y flora acuática de esta zona; el punto AS.S fue tomados en la comunidad humana más cercana del nevado Cayambe, en este punto se observó plantaciones agrícolas y animales domésticos, de acuerdo el TULSMA Libro VI Anexo 1 tabla 12 (Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce), estos parámetros si se encuentran en los rangos permisibles, ya que estos puntos están dentro de zonas pobladas y por esta razón se hace referencia a la tabla 12, estos parámetros se refieren a descarga de agua cruda o tratada. Según Ada Barrenechea considera que el pH de las aguas tanto crudas como tratadas debería estar entre 5,0 y 9,0; por lo general este rango permite controlar sus efectos en el comportamiento de otros constituyentes del agua. (Barrenechea, 2004). Según D. Garzón y K. Kampmann, el pH es el factor dominante que impulsa la variabilidad en la diversidad, el pH óptimo de crecimiento para las bacterias psicrófilas es de 4,5 a 7,8, la mayoría de estas bacterias

se desarrollan en medios de pH neutros, por esta razón se denomina bacterias neutrófilas, aunque algunas de estas bacterias viven en pHs ligeramente ácidos; como se puede observar en el gráfico las muestras PH.LI, PA.LI, PH.S y PA.S tiene valores neutros, cumplen normalmente con sus funciones vitales; las muestras PQ.LI, PR.LI, AS.LI, PR,S y AS.S se encuentran en rangos de 5.4 a 7; sin embargo la muestra PQ.S tiene un pH alcalino de 8.13 debido a que en este punto hay presencia de actividades antropogénicas.

6.2.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Tabla 4: *Parámetros Químicos: DQO (mg/l)*

MUESTRAS			INVIERNO ABRIL 2017	VERANO AGOSTO 2017
PH			75	72
PA			90	95
PQ			79	89
PR			267	279
AS			119	109
*TULSMA ANEXO I	LIBRO	VI	250 (mg/L)	

*NOTA: FUENTE TULSMA LIBRO VI ANEXO I
Fuente: La autora

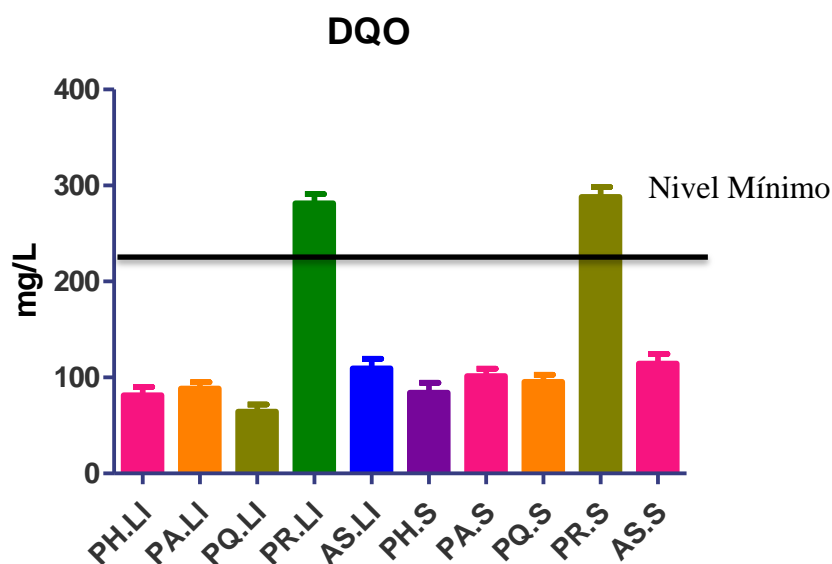


Figura 5: Muestras DQO
Elaborado por: Karla Lima

La figura 5 indica el DQO determina la cantidad de oxígeno requerido para oxidar, la materia orgánica e inorgánica de una muestra. Como se puede evidenciar en la tabla 4, las muestras

PH.LI, PA.LI, PQ.LI, AS.LI, PH.S, PA.S, PQ.S, y AS.S, se encuentran dentro de los límites máximos permisibles, de acuerdo con el TULSMA Libro VI Anexo 1 tabla 12 (Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce); sin embargo los puntos de muestreo PR.LI (267 ppm), PR.S (279 ppm), sobrepasan el rango, además se puede señalar que en dichos puntos hay descargas de agua de diferentes afluentes como puede ser aguas lluvia, filtrada, entre otras.

En los puntos mencionados anteriormente, se encuentra fauna de todo tipo; según Romero y Chamorro indican que el rango permisible del DQO es de 250 mg/L, de igual manera señalan que de acuerdo con el límite máximo permisible de descarga según la ordenanza del Distrito Metropolitano de Quito el de DQO es de 123 mg/L. (Romero & Chamorro, 2014); los dos criterios son técnicos por tal manera se toma como referencia los parámetros máximo permisibles del MAE. En las muestras obtenidas muestran diferentes parámetro, esto se da por los cambios de temperatura en el Ecuador tenemos el clima lluvioso y seco, Zuleta afirma que la radiación es un factor determinante para los cambios de clima en las diferentes épocas del año ya sea húmedo o seco, explicando que la energía proveniente del Sol se ubica en la longitud de onda corta, con valores de hasta 4 μm . Al toparse con la superficie, una parte de ella sirve para calentarla, otra parte en cambio se refleja en forma de onda larga, cuya longitud de onda es mayor a los 4 μm , produciendo el calentamiento del aire, especialmente si estos rayos se chocan con las moléculas de CO_2 , con vapor de agua, CH_4 (efecto invernadero). Dado el caso de que la atmósfera se encuentre despejada, la irradiación de la energía de onda larga producida en la noche sale directamente hacia la atmósfera superior, dando como resultado que las capas del aire y la superficie sufren un gran enfriamiento. (Zuleta, 2017)

Las bacterias son de gran importancia para determinar el grado de contaminación que se encuentra el agua, por tal motivo se hizo el estudio de la demanda química de oxígeno (DQO), los efluentes que nacen del nevado Cayambe, se encuentran amenazadas por varios contaminantes, ya que en esta zona hay actividades antropogénicas, (plantaciones agrícolas, animales domésticos, desechos de fertilizantes, entre otros. Paula Arroyo afirma que el filo Firmicutes absorbe metales pesados afectando al metabolismo de las bacterias psicrófilas consumiendo más fuentes de carbono sin embargo, la actividad metabólica transforma: las sustancias tóxicas, degradan contaminantes para la preservación de flora y fauna presente en los diferentes afluentes que nacen del nevado Cayambe. Como se puede observar en la figura 5 cumple con los rangos permisibles para descarga de aguas residuales.

6.2.3 Sólidos Totales

Tabla 5: *Parámetros Químicos: Sólidos Totales (mg/l)*

MUESTRAS			INVIERNO ABRIL 2017	VERANO AGOSTO 2017
PH			25	33
PA			35	63
PQ			112	178
PR			67	189
AS			122	126
*TULSMA	LIBRO	VI	130 (mg/l)	
ANEXO I				

*NOTA: FUENTE TULSMA LIBRO VI ANEXO I
Fuente: La autora

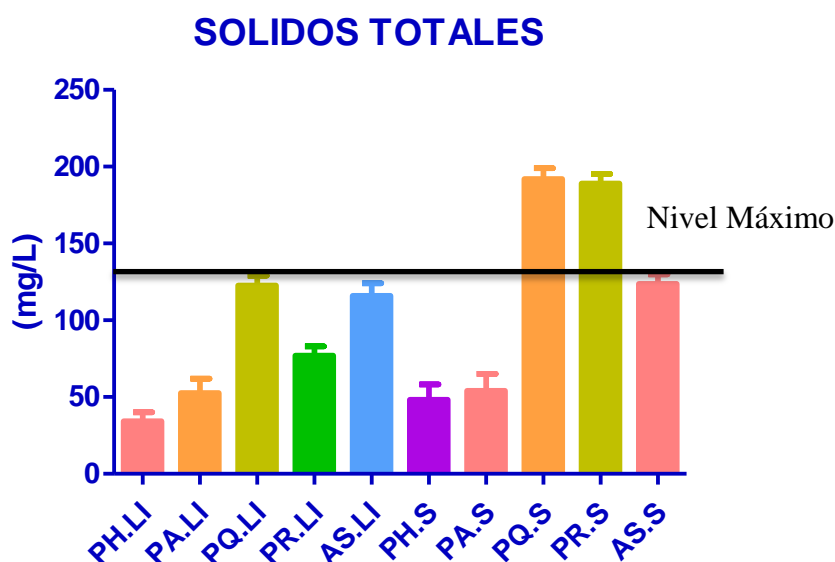


Figura 6: Muestras de Sólidos Totales
Fuente: La autora

La figura 6 indica que los sólidos totales de las muestras PH.LI, PA.LI, PQ.LI, PR.LI, AS.LI, PH.S, PA.S y AS.S, se encuentran dentro de los parámetros máximos permisibles de acuerdo con el TULSMA Libro VI Anexo 1 tabla 12, no obstante en las muestras PR.S (189 ppm) PQ.S (178 ppm), poseen niveles altos de sólidos totales, por lo tanto no están dentro de los parámetros permisibles. Las muestras señaladas que no cumplen con los rangos permisibles tienen altas concentraciones de sólidos totales que pueden estar en el fondo de un cuerpo de agua, cubriendo organismos acuáticos, huevos o larvas de macro invertebrados, consecuentemente es depósito de sólidos totales que puede impedir la transferencia de oxígeno y resultar la muerte de los organismos enterrados en cierta agua; según Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de

Colombia artículo 20 indica que los límites máximos permisibles para S. T. es de 200 mg/l (MINAMBIENTE, 2010), se consideró para este análisis los máximos permisibles del TULSMA.

Torres señala que el análisis de sólidos es importante en el control de procesos de tratamiento biológico y físico de aguas residuales, para evaluar el cumplimiento de las limitaciones que regulan su vertido. Los sólidos totales son un factor determinante para el crecimiento bacteriano o desarrollo del mismo por tal motivo se tomó en cuenta este parámetro si los efluentes se encuentran contaminados con exceso de sólidos totales impiden las funciones vitales de las bacterias provocando la muerte. Como se puede observar en la figura 6 las muestras PR.S, y PQ.S, tienen niveles altos de sólidos totales que pueden ocasionar la muerte de las bacterias presentes en los efluentes según lo señalado.

6.3 Análisis molecular de las comunidades bacterianas

6.3.1 Caracterización molecular

Las bandas extraídas por le DGGE se analizaron en el software Primer 7 en el cual se definieron las bandas más representativas con una intensidad superior o igual al 5% y al 60% y se identificó en una matriz binaria la presencia (1) o ausencia (0) de bandas

Las bandas fueron comparadas mediante una matriz binaria. Cada banda fue usada para la construcción de una matriz de distancia; con la cual, el diagrama de escalamiento multidimensional (MDS) se construye. El MDS es un mapa que contiene ejes artificiales X y el eje Y donde la imagen de DGGE se coloca como un punto de forma que las muestras similares son representadas juntas.

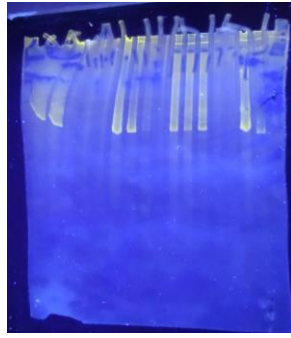


Figura 7: Visualización de las bandas más representativas de gradiente de desnaturalización (DGGE) 20%-60% y separación de las OTU's más representativas.

Fuente: La autora

En la figura 7 se evidenciaron 10 bandas más representativas del gel, con una gradiente de desnaturalización del 20% - 60%, fueron extraídas, purificadas, amplificadas y secuenciadas para ser analizadas. Las secuencias relativas más cercanas analizadas en el Gen Bank son:

Tabla 6 *Secuencias relativas del análisis DGGE.*

Banda	Secuencia relativa cercana	Grupo bacteriano	Longitud de ADN	Gen Bank no. acceso
1	<i>Bacillos simplex</i>	Firmicutes	1433 bp	NR_115603.1
3	<i>Carnobacterium divergens</i>	Firmicutes	1481BP	NR_113798.1
4	<i>Lactobacillus hokkaidonensis</i>	Firmicutes	1502 bp	NR_114335.1
4	<i>Lactobacillus wasatchensis</i>	Firmicutes	1571 bp	NR_147709.1
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	<u>NR_113773.1</u>
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

7	<i>Carnobacterium iners</i>	Firmicutes	1512 bp	NR_108864.1
---	-----------------------------	------------	---------	-------------

Fuente: La autora

La clasificación taxonómica pertenece a 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)

El género Carnobacterium contiene nueve especies, pero solo *C. divergens*, se aíslan con frecuencia en ambientes fríos y alimentos naturales, mientras que las *Carnobacterium funditum* se aíslan solo en ambientes fríos al igual que las *Carnobacterium iners*. Son tolerantes al congelamiento / descongelamiento y a la alta presión y pueden crecer a bajas temperaturas, de

forma anaeróbica y con mayores concentraciones de CO₂. Metabolizan diversos carbohidratos, incluida la quitina, esto puede mejorar su supervivencia en el medio ambiente. Actualmente no se aplican comercialmente aislamientos como cultivos protectores. Las Carnobacterium pueden echar a perder los alimentos refrigerados, pero la actividad de descomposición. Los metabolitos responsables de la descomposición no están bien caracterizados, pero los alcoholes ramificados y los aldehídos desempeñan un papel parcial. Las Carnobacterium no son patógenos humanos, pueden ser un patógeno de peces, aunque también se sugieren Carnobacterium como cultivos prebióticos para su uso en acuicultura (reproducción de peces). (Laursen BG., 2005)

Se realizó un escalamiento espacial de relación Bray-Curtis en base a una matriz binaria de presencia o ausencia de las OTU's encontradas. Se llevó a cabo un análisis de similitud por medio de la metodología de escalamiento multidimensional, utilizando una matriz de distancia, la cual, posee la relación Bray-Curtis. Como se puede observar en las figuras 12 y 13.

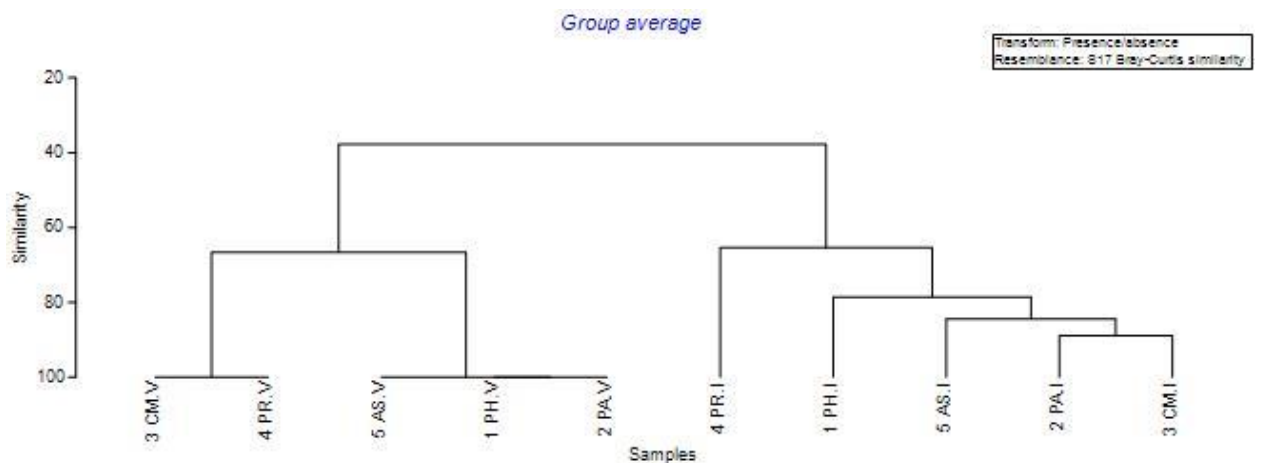


Figura 8 Análisis de similitud obtenidas mediante análisis del gen ARNr 16s por DGGE.

Fuente: La autora

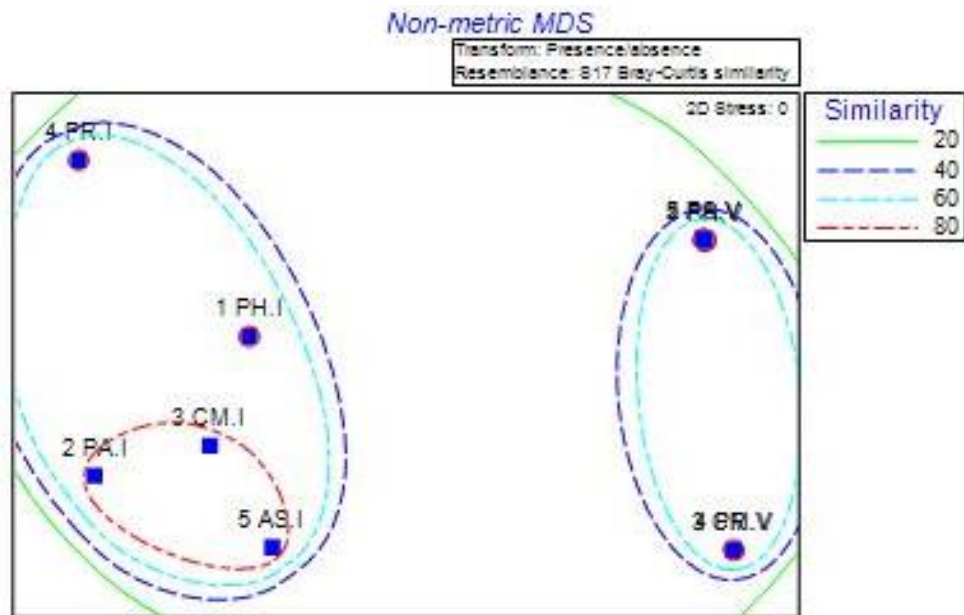


Figura 9 Escalamiento multidimensional obtenidas por el DGGE.

Fuente: La autora

Como se puede observar en la figura 9 tenemos dos grupos bien definidos un grupo conformado solo por bacterias de invierno y otro grupo conformado por bacteria de verano, esto se debe a las características de contaminación, que se encontró en las diferente zonas además influye los diferentes estados que se tomó las muestras, en estado seco y húmedo.

Los análisis de similitud, entre las comunidades bacterianas presentes en las muestras, se estudiaron mediante el método de escalamiento multidimensional (MDS) el cual utiliza la matriz de Bray=Curtis. (Mafla, 2013)

Este análisis mostró que al 60% de similitud, encontramos comunidades bacterianas, existían 2 grupos definidos, el primer grupo formado por las muestras de verano (3PC.S, 1PH.S, 5AS.S, 4PR.S, 2PA.S); estas bacterias están agrupadas según el clima en el cual se encuentra; el segundo grupo fue formado por las muestras de Invierno (PR.LI, PH.S, PA.LI PC.LI, AS.LI); el 80% de similitud formado por un grupo definido (2PA.LI, 5AS.LI, 3PC.LI).

Para el caso del 40% de similitud existen dos grandes grupos definidos siendo el primer grupo formado por las muestras de invierno (1PH.LI, 2PA.LI, 3PC.LI, 4PR.LI y 5AS.LI) que estas comunidades bacterianas son solo de invierno, el segundo grupo lo conformaron las muestras de verano (1PH.S, 2PA.S, 3PC.S, 4PR.S y 5AS.S) finalmente existe un 20% de similitud entre

todas las muestras. Estos patrones fueron confirmados por el análisis de índice de BrayCurtis encontrándose el mismo orden Jerárquico entre las muestras.

Índices de Shannon (H')

Los índices más utilizados para cuantificar la biodiversidad específica es el de Shannon. El índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa.

El índice de Shannon (Shannon y Weaver, 1949) se define como

$$H = - \sum_{i=1}^S \pi_i \ln \pi_i$$

La diversidad máxima ($H_{max} = \ln S$) se alcanza cuando todas las especies están igualmente presentes. Un índice de homogeneidad asociado a esta medida de diversidad puede calcularse como el cociente $H/H_{max} = H/\ln S$, que será uno si todas las especies que componen la comunidad tienen igual probabilidad ($\pi_i = 1/S$).

El índice de Shannon (H') indica una diversidad específica en PA.LI, PR.LI y AS.LI de 1,609, y en las demás muestras arrojan diferentes valores tales como PH.LI de 1,099, PQ.LI de 1,386, PH.S y PA.S de 0, PQ.S y PR.S de 0,6931 y AS.S de 0, indicando así, que la diversidad en los puntos PA.LI, PR.LI y AS. LI es superior a los restantes puntos de muestreo además señala que mayor diversidad ecológica existe en invierno vs verano. Lo mismo sucede con la dominancia de los puntos PA.LI, PR.LI y AS.LI sobre PH.LI, PQ.LI, PH.S, PA.S, PQ.S, PR.S y AS.S. Los índices d y (H') muestra la presencia de un factor de alteración en los puntos PH.LI, PQLI, PH.S, PA.S, PQ.S, PR.S y AS.S, que reduce la diversidad ecológica en estos puntos, así como la reducción de especies bacterianas. Según Lánuez los microorganismos sufren los cambios ambientales de un modo mucho más directo e inmediato; las únicas formas de vida existentes en determinados ambientes extremos son exclusivamente de microorganismo sin embargo por las actividades antropogénicas y el efecto invernadero cada vez se está perdiendo la diversidad de especies, tales como PH.S, PA.S y AS.S que su índice de (H') es cero demostrando que efectos ambientales tienen un papel fundamental sobre los microorganismos.

Tabla 7 Índices de Diversidad Ecológica

Muestra	d	H'(loge)
PH.LI	1,82	1,099
PA.LI	2,485	1,609
PQ.LI	2,164	1,386
PR.LI	2,485	1,609
AS.LI	2,485	1,609
PH.S	****	0
PA.S	****	0
PQ.S	1,443	0,6931
PR.S	1,443	0,6931
AS.S	****	0

Fuente: La autora

*d: dominancia entre especies de microorganismos presentes.

6.4 Análisis de la caracterización metabólica (EcoPlate™)

La caracterización metabólica se realizó en 5 puntos de muestreo. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante t student. Los resultados de las fuentes de carbono y los índices se obtuvieron a las 120 horas.

Las comunidades microbianas brindan información útil sobre el cambio ambiental. Los microorganismos están presentes en prácticamente todos los entornos y suelen ser los primeros organismos en reaccionar a los cambios químicos y físicos en el medio ambiente. Los cambios en las comunidades microbianas suelen ser un precursor de los cambios en la salud y la viabilidad del medio ambiente en general.

Los microplacas de 6 pocillos incorporan un colorante de tetrazolio Redox patentado que cambia de color como resultado de la respiración celular y proporciona una huella metabólica. Esta técnica se usa cada vez más frecuentemente para estimar el impacto del factor de estrés, como metales pesados o contaminación por hidrocarburos, alta salinidad y alto pH del suelo [, o calentamiento global. El método Biolog está más dedicado a comparar la investigación, por ejemplo, para comparar la diversidad funcional de las comunidades microbianas de los tratamientos contaminados y no contaminados en lugar de la comunidad microbiana característica. (Gryta, 2014)

6.4.1 Caracterización Metabólica en Invierno y Verano

Fuentes de Carbono Complejo

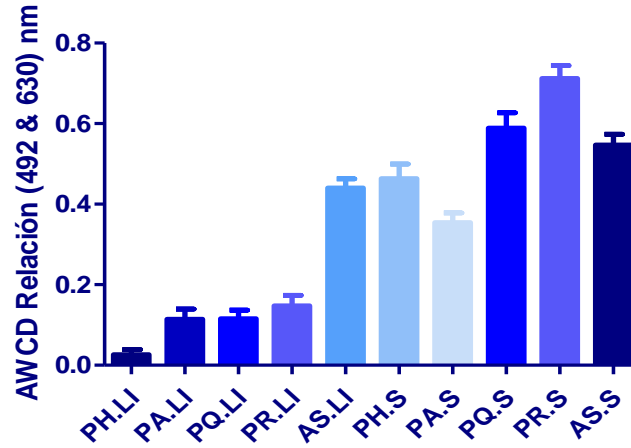


Figura 10 Consumo de Fuentes de Carbono Complejo en Invierno y Verano

Fuente: La autora

El consumo de fuentes de Carbono complejo en seco y húmedo tiene una diferencia significativa de $P < 0.05$; como se puede observar en la figura 10 las bacterias que se encontraban en invierno consumieron menos fuentes de carbono, mientras que las bacterias de verano necesitaron consumir mayor fuentes de carbono. Las comunidades mostraron una diversificación metabólica en la oxidación de la fuente de carbono, por tal razón PH.LI consumió menos fuentes de carbono con respecto a PH.S.

Ácidos Carboxílicos

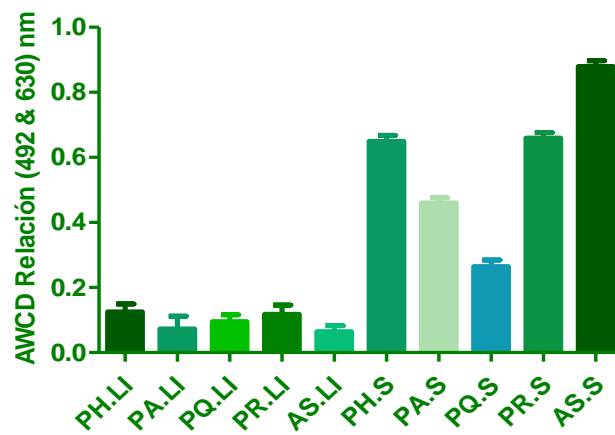


Figura 11 Consumo de Ácidos Carboxílicos en Invierno y Verano

Fuente: La autora

El análisis de ácidos carboxílicos si hay diferencias significativas de $P < 0.05$; como se puede observar en la figura 11 las bacterias psicrófilas consumieron menos ácidos carboxílicos porque se encontraban en su habitat, mientras que las bacterias psicrófilas en verano necesitaron consumir más fuentes de carbono por las condiciones climáticas que se encontraban. La acumulación de ácidos carboxílicos consumidos por bacterias psicrófilas de filo firmicutes, es el resultado de la oxidación incompleta del sustrato y generalmente se inicia por un desequilibrio en algunos nutrientes esenciales. (Kubicek & Karaffa, 2006); Por esta razón hay un consumo de ácidos carboxílicos en la muestra AS.LI en comparación a AS.S.

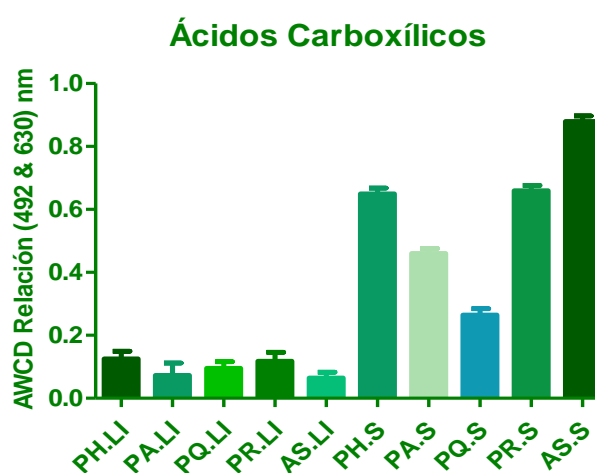


Figura 12 Consumo de Aminas en Invierno y Verano
Elaborado por: Karla Lima

El consumo de aminas si hay diferencias significativas de $P < 0.05$; como se puede observar en la figura 12, las bacterias psicrófilas consumieron menos aminas en invierno, mientras que en verano consumieron más aminas, un ejemplo claro es en AS.LI con 0.0637 nm vs AS.S con 0.4481 nm. Las bacterias psicrófilas oxidaron las aminas para producir energía para su sobrevivencia.

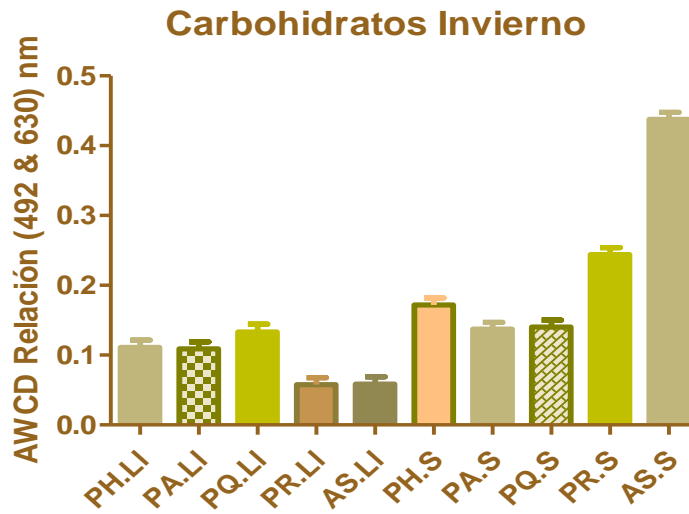


Figura 13 Consumo de Carbohidratos en Invierno y Verano
Fuente: La autora

El consumo de carbohidratos se encontró diferencias significativas de $P < 0.05$; como se puede observar en la figura 13, las bacterias psicrófilas consumieron menos carbohidratos en invierno, sin embargo las muestras de verano consumieron más carbohidratos, un ejemplo es AS.LI con 0.0587nm vs AS.S con 0.4376nm. Los carbohidratos realizan la fermentación para la producción de energía dentro de la dinámica microbiana (Varela & Grotiuz, 2008); por tal motivo se evidencia que la muestra AS.LI tiene un bajo consumo, la muestra AS.S tiene en alto consumo, indicando que necesito consumir más energía para adaptarse al medio en el que se encontró.

6.5 Socialización

La socialización se realizó en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede – Ibarra, el día 17 de mayo de 2018 a las 14:00h. Se realizó en las aulas de la PUCESI y se contó con la presencia de 25 estudiantes y 3 Ingenieros de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede – Ibarra.

La ejecución de la socialización del proyecto de investigación, se realizó una presentación power point, y se expusieron los temas más importantes de la investigación, luego de la exposición y de responder inquietudes de la audiencia, se entregó una acta de asistencia y una encuesta, con el fin de valorar el contenido de la investigación.

La figura 26 revela que el evento brindó las comodidades necesarias, tuvo como resultado alto, además se puede observar que el material de audiovisual fue adecuado determinando como muy alto.



Figura 14: Tabulación de la Organización del Evento
Fuente: La autora

La figura indica que el dominio del tema por parte del expositor, tuvo como resultado alto, en cuanto al manejo del auditorio por parte del expositor señaló como resultado medio, en facilidad de expresión dio como resultado alto.

Ejecución del evento por parte del Expositor

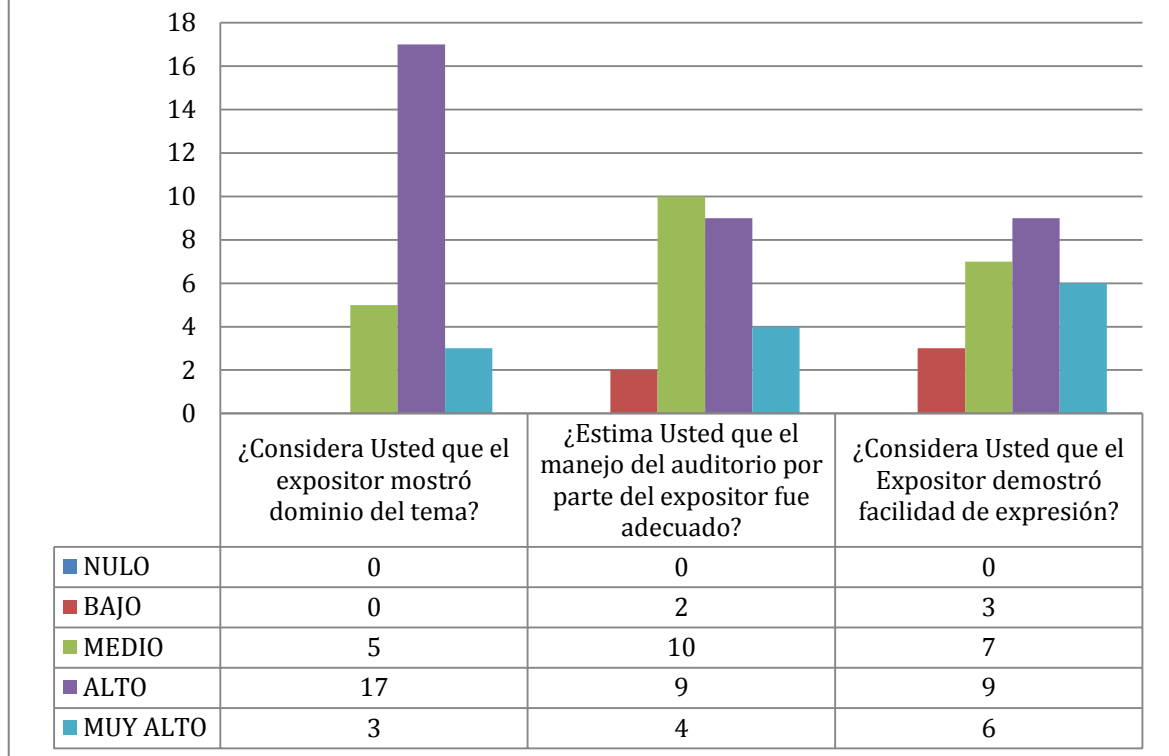


Figura 15: Tabulación de Ejecución del evento por parte del Expositor
Fuente: La autora

La figura 30 señala que el tema investigado posee relevancia para la sociedad, tuvo un resultado alto, en cuanto para estudios complementarios dio como resultado alto, con respecto al tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución señaló que como resultado muy alto, y por ultimo refiriéndose a la pregunta; en función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron, dio como resultado con una aceptación de muy alto.

MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN

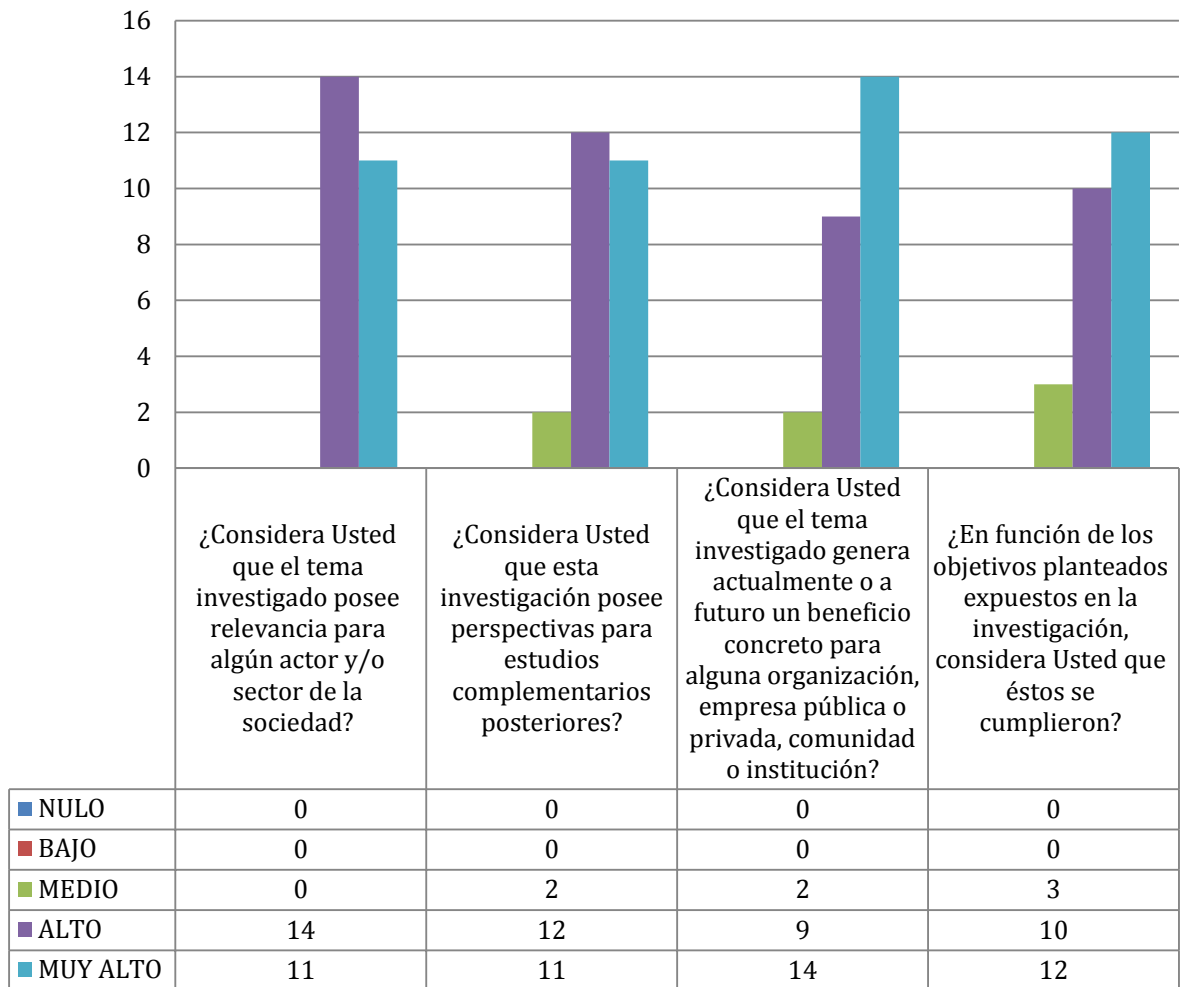


Figura 16: Tabulación de Medición de Impacto de la Investigación
Fuente: La autora

7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

Se realizó una salida de campo, en la cual se determinó 5 puntos de muestreo, en la que se evidencio mayor actividad antropogénica en las partes bajas del nevado Cayambe, debido a que la agricultura y la ganadería es viable en esta zona y menor actividad en las zonas altas debido a las condiciones climáticas.

El análisis de las bacterias psicrófilas muestra estas se desarrollan en pHs neutros y ligeramente ácidos, nueve de diez muestras obtenidas se encontraron en un rangos de 5.2 a 7; sin embargo la muestra PQ.V se encontró en pH 8 ligeramente alcalino. En cuanto al estudio de los sólidos totales determino que si los efluentes se encuentran muy contaminados impiden el desarrollo de las funciones vitales de las bacterias provocando la muerte.

Los análisis de DQO determinaron que el Phylum Firmicutes ayuda a la absorción de metales pesados y la actividad metabólica transforma y degrada contaminantes presentes en el agua para la conservación de flora y fauna de los diferentes afluentes del nevado Cayambe. En cuanto al análisis de la calidad de agua la mayoría de las muestras PH, PA, PQ, AS tanto en seco como en húmedo cumple con los parámetros máximos permisibles, sin embargo algunas muestras no cumplen con los límites máximos permisibles en base al TULSMA, tales como punto Riachuelo invierno (PR.I) y punto Riachuelo verano (PR.V).

El escalamiento multidimensional del patrón de bandas (MDS) indicó que existe un 20% de similitud entre las muestras, además se evidenció la presencia de bacterias psicrófilas de la familia Carnobacteriaceae, género Carnobacterium.

El análisis EcoPlate™ marcó que el consumo de fuentes de carbono es menor en Agua Sucia en lluvioso (AS.LI) debido a que la respiración de las bacterias es normal y constante lo que ocasiona que no exista un desgaste anormal en su metabolismo, en cuanto al Agua Sucia en seco (AS.S), se evidencio una respiración acelerada, ocasionando que consuman mayor fuentes de carbono para mantenerse estables, desarrollarse y adaptarse en el medio que se encontraron;

cuando la respiración de las bacterias era mayor el colorante de tetrazolio Redox se tornaba de otro color como resultado de la respiración celular.

7.2 Recomendaciones

Desarrollar un aislamiento de cepas bacterianas de ambientes fríos para remoción de metales pesados

Identificar microorganismo de ambientes fríos para biorremediación y el desarrollo aplicación de la industria biotecnológica.

Determinar la producción enzimática utilizando sustratos diferentes dado la importancia de las enzimas psicrófilas en los diferentes tipos de industrias

Se deben tomar acciones inmediatas orientadas a proteger y salvaguardar el patrimonio genético representado en la biodiversidad microbiana existente en los diferentes ambientes extremos del territorio.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Aliaga, M. E. (2015). *Morfología y estructura de las bacterias*. Chile: Universidad Santo Tomás.
- Andrea, M. (2013). *Demanda Biológica de Oxígeno*. España: Alambra.
- 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 .
- Bujan, D. (2014). *Análisis de agua*. Colombia: Universidad Politécnica de Cartagena.
- 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.
- Castillo, F., Róldan, M., & Blasco, R. (2005). *Biotecnología ambiental*. España.
- 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.
- Gerard, C. (2013). *Enzimas psicrófilas*. Bélgica: Universidad de Liége.
- Granada, C. A. (2014). *Biotecnología de microorganismos extremófilos*. Colombia: Universidad Católica de Manizales.
- Hernández, M. A. (2014). *Transformación de los sistemas naturales por actividades antropogénicas*. México: CONABIO.
- Horikosh, K., & Bull, A. (2011). *Extremophiles Handbook*. Reino Unido.
- Kubicek, C., & Karaffa, L. (2006). *Ácidos orgánicos*. Reino Unido.
- Kurihara, T., & Esaki, N. (2008). *Estudios proteínicos de microorganismos psicrófilos*. Alemania.
- Landa, F. D. (2012). *Evaluación de los ecosistemas en México*. México: CONABIO.
- Lañez, E. (2005). *Microbiología General*. España.
- Laursen BG., B. L. (2005). *Departamento de Patobiología Veterinaria, Real Universidad Veterinaria y Agrícola*. Dinamarca.
- Maldigan, 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.
- Mejía, J., Solórzano, J., & Gómez, P. (2015). *Análisis de agua superficiales de centros poblados de Marian destinados para uso agrícola*. Perú.
- Metpally, R. (2010). *Comparación y análisis*. Brasil.
- MINAMBIENTE. (2010). *Parámetros específicos a monitorear en los vertimientos puntuales y valores límites máximos permisibles*. Colombia.
- 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 subcuenta 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.
- Pérez, C. (2013). *Tratamiento de agua*. México: Universidad Autónoma de México.
- Pírez, 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.
- Rodríguez, 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 transcriptora*. Estados Unidos.
- 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 Cudinamarca.
- Scientific, C. d. (15 de Enero de 2017). *CBS SCIENTIFIC CO. DGGE-4000 denaturación de gradient gel electroforesis cell. scientific co*. Recuperado el 2 de Abril de 2018, de www.cbsscientific.com
- Valenzuela, L. C. (2014). *La química del agua*. México: Plaza y Valdés.
- Varela, G., & Grotiuz, G. (2008). *Fisiología y Metabolismo Bacteriano*. Uruguay.
- Villalta, J. D. (2014). *Estudio polifásico de bacterias psicrófilas*. Ecuador: Universidad de Guayaquil.
- Zuleta, C. (2017). *Meteorología - Climatología. Fundamentos básicos*. Alemania: Cuvillier Verlag Gottingen.

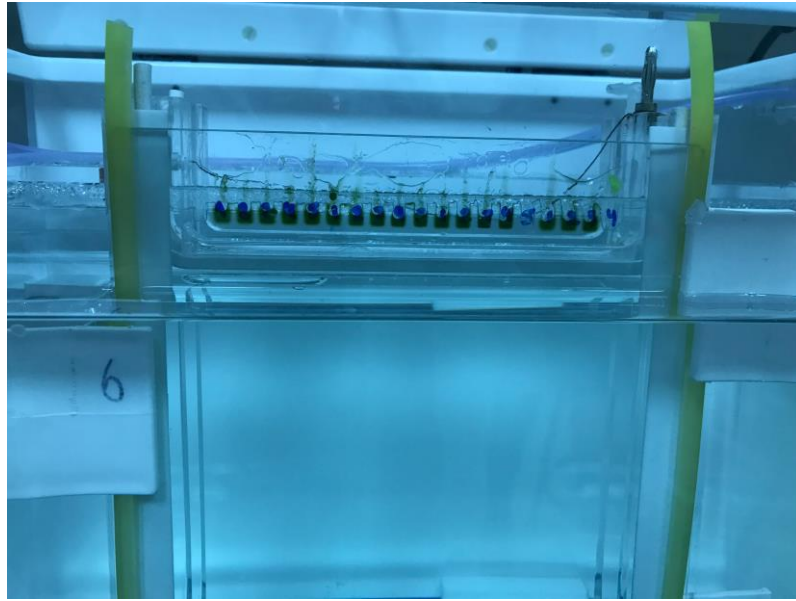
9 ANEXOS



Anexos 1: Recolección de Muestras



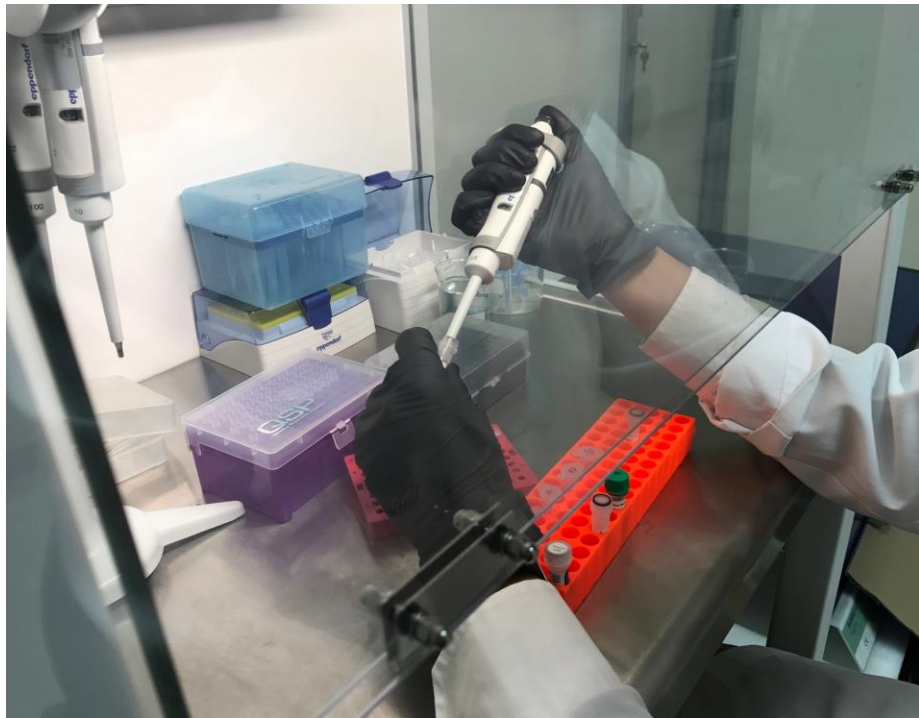
Anexos 2: Extracción de ADN



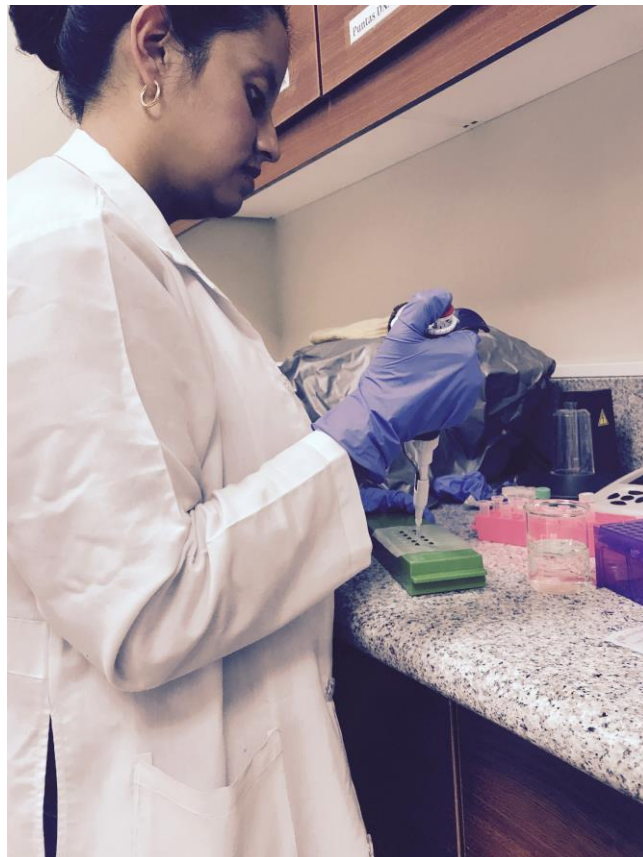
Anexos 3: Técnica de DGGE



Anexos 4: Colocación de ADN en el gel de DGGE



Anexos 5: Amplificación del ADN



Anexos 6: Preparación del ADN