



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LAS BACTERIAS
LIPOLÍTICAS DE RUMEN DE VACA PARA LA DEGRADACIÓN
DE AGUAS RESIDUALES CON GRASAS Y ACEITES**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: YADIRA CARMEN PAZMIÑO FLORES

TUTORA : ING.SOFÍA GODOY

Riobamba - Ecuador

2016

©2016, Yadiria Carmen Pazmiño Flores

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de Investigación: EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LAS BACTERIAS LIPOLÍTICAS DE RUMEN DE VACA PARA LA DEGRADACIÓN DE AGUAS RESIDUALES CON GRASAS Y ACEITES, de responsabilidad de la señorita Yadira Carmen Pazmiño Flores, ha sido minuciosamente revisado por el Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

Fecha

Firma

Ing. Sofía Godoy

DIRECTORA DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

BQF. Graciela Guerrero

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo YADIRA CARMEN PAZMIÑO FLORES soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

YADIRA CARMEN PAZMIÑO FLORES

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Yadira Carmen Pazmiño Flores, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 30 de noviembre del 2016

Yadira Carmen Pazmiño Flores

060341205-7

DEDICATORIA

La vida está llena de retos y las personas que nos acompañan en este camino son quienes nos brindan ánimo y esperanza para superar todas las dificultades, es por esto que dedico mi tesis a mi madre Carmita, quien me ha acompañado en cada etapa de mi vida con su amor y apoyo incondicional. A mi padre Sergio, quien me impulsa a seguir adelante y a cumplir todos mis sueños.

Se la dedico también a mis hermanas, Gabriela y Alexandra quienes han sido mi ejemplo a seguir y a mi sobrina Doménica que es la alegría de mi vida y mi motivo de superación.

Yadira

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento a Dios y a la Virgen María Auxiliadora, ya que en todo momento me han sabido guiar, para encontrar el mejor camino, conseguir mis metas. Gracias por iluminarme siempre.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a todos los docentes que fueron parte de mi formación estudiantil, especial a mi Directora de Tesis y Miembro de Tribunal quienes me apoyaron en cada paso de esta investigación.

Agradezco a todos quienes conforman el laboratorio LABIMA ya que fueron parte vital para la realización de esta tesis

Expreso mi agradecimiento a mi familia ya que son quienes confiaron en mí y estuvieron en todo momento para ayudarme a vencer los obstáculos.

Y a mis amigas, que formaron parte de esta etapa de mi vida, escucharon y apoyaron cada idea, propuesta para la realización de esta investigación.

Yadira

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE TABLAS.....	xi
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	xii
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1.2 Marco Conceptual.....	5
<i>1.2.1. Aguas Residuales de la Industria Láctea</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2. Microambiente Ruminal</i>	<i>7</i>
<i>1.2.3. Bacterias en el Rumen</i>	<i>7</i>
<i>1.2.4. Bacterias Lipolíticas</i>	<i>9</i>
<i>1.2.4.2. Temperatura.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.4.3. Nutrientes</i>	<i>10</i>
<i>1.2.5. Lipasas</i>	<i>10</i>
<i>1.2.6. Medios de Cultivo para Bacterias Lipolíticas.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.6.1. Agar Tributirina.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.6.2. Agar Lecitinasas.....</i>	<i>12</i>
<i>1.2.6.3. Agar Rojo Neutro</i>	<i>12</i>
CAPÍTULO II	
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	13
2.1 Metodología de la Investigación.....	13
<i>2.1.1. Lugar de la Investigación</i>	<i>13</i>
<i>2.1.2. Hipótesis y especificación de las variables</i>	<i>13</i>
<i>2.1.3. Tipo y Diseño de Investigación</i>	<i>13</i>
<i>2.1.4. Unidad de Análisis</i>	<i>13</i>
<i>2.1.5. Población de Estudio.....</i>	<i>13</i>
<i>2.1.6. Tamaño de Muestra</i>	<i>14</i>
<i>2.1.7. Selección de muestra</i>	<i>14</i>
<i>2.1.8. Técnicas de Recolección de Datos</i>	<i>14</i>
2.2. Procedimientos Realizados en el Estudio.....	14
<i>2.2.1 Evaluación de la Eficiencia de las Bacterias Lipolíticas de rumen de vaca para la Degradación de grasas y aceites</i>	<i>16</i>
<i>2.2.1.1 Verificación del medio selectivo para el aislamiento</i>	<i>16</i>

2.2.1.1.1.	<i>Recolección de las muestras de líquido ruminal</i>	16
2.2.1.1.2	<i>Preparación del medio de cultivo Tributirina</i>	16
2.2.1.1.3.	<i>Preparación del medio de cultivo Lecitinasas</i>	16
2.2.1.1.4.	<i>Preparación de los medios de cultivo Tributirina con lecitina al 5% y al 10%</i>	16
2.2.1.1.5.	<i>Siembra de las bacterias lipolíticas de la muestra del líquido ruminal</i>	17
2.2.1.1.6.	<i>Conteo bacteriano</i>	17
2.2.1.1.7.	<i>Identificación microscópica y macroscópica de las bacterias</i>	17
2.2.1.1.7.1.	<i>Microscópica</i>	17
2.2.1.1.8.	<i>Masificación de bacterias</i>	18
2.3.	Acondicionamiento de las 4 Unidades Experimentales para la Interacción de las bacterias Lipolíticas con grasas y aceites.	18
2.3.1.	<i>Pruebas para controlar el pH de las aguas residuales</i>	18
2.3.2.	<i>Inoculación de las bacterias lipolíticas a las unidades experimentales</i>	19
2.4.	Determinación de la Capacidad Degradativa de aceites y grasas de las Bacterias aisladas.	20
2.5.	Análisis Estadístico	20
2.5.1.	<i>Diseño de Componentes principales</i>	20
2.5.2.	<i>Prueba de Chi-Cuadrado</i>	20
CAPÍTULO III		
3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	21
3.1.	Verificación del medio selectivo para el aislamiento	21
3.1.1.	<i>Siembra de las bacterias lipolíticas</i>	21
3.1.1.1.	<i>Medio de Cultivo Tributirina</i>	21
3.1.1.2.	<i>Tributirina con lecitina al 5%</i>	22
3.1.1.3.	<i>Medio de Cultivo Tributirina con lecitina al 10%</i>	23
3.1.1.4.	<i>Medio de Cultivo Lecitinasas</i>	24
3.1.1.5.	<i>Verificación de los medios de cultivo para el aislamiento (Crecimiento Microbiano)</i>	25
3.1.1.6.	<i>Identificación macroscópica y microscópica de las bacterias</i>	27
3.2.	Acondicionamiento de las unidades experimentales para la interacción de las bacterias lipolíticas con grasas y aceites	29
3.2.1.	<i>Inoculación de las bacterias lipolíticas a las unidades experimentales</i>	29
3.2.1.1.	<i>Desarrollo de bacterias en las unidades de análisis (in vitro)</i>	29
3.3.	Determinación de la capacidad degradadora de aceites y grasa de las bacterias . aisladas	32
3.3.1.	<i>Actividad de las bacterias lipolíticas en las unidades experimentales (in vivo)</i>	32
3.4.	Análisis estadístico	39
3.4.1.	<i>Diseño de Componentes principales</i>	39
3.4.2.	<i>Prueba de chi-cuadrado</i>	46

CONCLUSIONES.....	48
RECOMENDACIONES.....	49

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1-3: Crecimiento microbiano en el medio de cultivo Tributirina a 37 ° C.....	21
Tabla 3-3: Crecimiento microbiano en el medio de cultivo Tributirina con lecitina al 10% a 37 °C.....	23
Tabla 4-3: Crecimiento microbiano en el medio de cultivo Lecitinasa	24
Tabla 5-3: Identificación de las bacterias según la morfología.....	27
Tabla 6-3: Crecimiento microbiano de las bacterias en las unidades de análisis.....	30
Tabla 7-3: Actividad de las bacterias lipolíticas	32
Tabla 8-3: Matriz de correlaciones	40
Tabla 9-3: Prueba de KMO y Bartlett.....	40
Tabla 10-3: Comunalidades	41
Tabla 11-3: Matriz de componente de rotado	43
Tabla 12-3: Matriz de coeficiente de puntuación de componente	45
Tabla 13-3: Prueba de chi-cuadrado.....	46

INDICE DE ILUSTRACIONES

Pág.

Ilustración 1-3.	Gráfico de Procedimientos Realizados en el Estudio.....	15
Gráfico 2-3.	Crecimiento microbiano en medio aerobio.....	25
Gráfico 3-3.	Crecimiento microbiano en medio anaerobio.....	26
Figura 4-3.	Identificación Microscópica.....	29
Gráfico 5-3.	Crecimiento microbiano en las unidades de análisis.....	31
Gráfico 6-3.	Concentración de Grasas y Aceites.....	34
Gráfico 7-3.	Porcentajes finales de reducción de grasas y aceites.....	35
Gráfico 8-3.	Crecimiento Microbiano Blanco Aerobio.....	36
Gráfico 9-3.	Crecimiento Microbiano Blanco Anaerobio.....	37
Gráfico 10-3.	Crecimiento Microbiano Medio Aerobio.....	38
Gráfico 11-3.	Crecimiento Microbiano Medio Anaerobio.....	39
Gráfico. 12-3.	Sedimentación.....	42
Gráfico 13-3.	Componente en espacio rotado.....	44
Gráfico 14-3.	Compilación de datos.....	47

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo la evaluación de la eficiencia de las bacterias lipolíticas de rumen de vaca para la degradación de aguas residuales con grasas y aceites, fue desarrollada en la ciudad de Riobamba en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Para el aislamiento e inoculación de estas bacterias se siguió la siguiente metodología. Se tomó muestras del líquido ruminal para el aislamiento de las bacterias, se hicieron siembras en medio aerobio, anaerobio y en diferentes agares, para verificar cuales son las mejores condiciones para el desarrollo de estos microorganismos. Luego se hizo un conteo de colonias y una tinción gram. Una vez escogido el mejor medio y las bacterias con las cuales se iba a trabajar, se procedió hacer una masificación de las bacterias. Para la inoculación de las bacterias, se midió el pH del agua y este fue de 3,8 pH muy ácido para el crecimiento de estos microorganismos, ya que crecen en un pH de 6-7, por ello se decidió agregar bicarbonato de sodio para elevar el rango de pH. Se trabajó con dos blancos y dos unidades a las cuales se les inoculó las bacterias. Todas las unidades fueron incubadas en ambientes aerobios y anaerobios a una temperatura de 37 °C. Se dejaron pasar 13 y 28 días para realizar análisis de demanda bioquímica de oxígeno DBO₅, oxígeno disuelto, crecimiento microbiano, grasas y aceites. Al finalizar el proceso el medio anaerobio fue el mejor para el desarrollo de estas bacterias ya que se logró reducir las grasas en un 52%. En el medio aerobio, blanco aerobio también se redujeron las grasas, pero no en gran medida. En el blanco anaerobio las concentraciones de grasas se mantuvieron igual. Se recomienda realizar el estudio por más de 28 días para conocer como las bacterias continúan su desarrollo.

PALABRAS CLAVE:

<TECNOLOGIA Y CIENCIAS DE LA INGENIERIA>, <MICROBIOLOGIA>, <BACTERIAS LIPOLÍTICAS>, <AISLAMIENTO DE BACTERIAS >, <INOCULACIÓN DE BACTERIAS>, <DEGRADACIÓN DE AGUAS RESIDUALES>

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the efficiency of cow tureen lipolytic bacteria for the degradation of wastewater with and oils. It was developed in the city of Riobamba in the Biotechnology and Animal Microbiology Laboratory of The Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. For the isolation and inoculation of these bacteria, the following methodology was applied; samples of the luminal liquid were collected for the isolation of the bacteria, aerobic, anaerobic and in different agars were sown in order to verify the best conditions for the development of these microorganisms. Then a colony count and gram stain were made. Once the best medium and the bacteria for working were chosen, the process of making a massification of the bacteria continued. For the inoculation of the bacteria, the pH of the water was measured pH 3.8 and this was very acidic for the growth of these microorganisms, since they grow at a pH of 6-7, so it was decided to add sodium bicarbonate to raise the pH range. It was worked with two control groups and two units to which the bacteria were inoculated. All units were incubated in aerobic and anaerobic environments at a temperature of 37 O C. Then 13 and 28 days were allowed to perform biochemical oxygen demand analysis of BOD5, dissolved oxygen, microbial growth, fats and oils. At the end of the process, the anaerobic medium was the best for the development of these bacteria as it was possible to reduce fat by 52%. In the aerobic medium, aerobic control group also reduced fats, but not to a great extent. In the anaerobic control group, the fat concentrations remained the same. It is recommended to carry out the study for more than 28 days to know how the bacteria continue their development.

KEYWORDS:

<ENGINEERING TECHNOLOGY AND SCIENCES>, <MICROBIOLOGY>, <LYPOLYTIC BACTERIA>, < BACTERIA INSULATION >, <BACTERIA INOCULATION>, <WASTERWATER DEGRADATION>

INTRODUCCIÓN

Identificación del problema

En el camal de la ciudad de Riobamba ubicado en la Parroquia Maldonado, en las calles avenida Leopoldo Freire y circunvalación, diariamente se faenan alrededor de cien vacas, en el estómago de estos animales existe un promedio de 4 litros de líquido ruminal, es decir que diariamente se produce 400 litros de este componente.

Las industrias lácteas debido a los procesos que realizan para la obtención de sus productos por lo general son generadoras de grasas y aceites, y en la provincia de Chimborazo gran parte de estos componentes son evacuados en las aguas residuales. Para el estudio se consideró a la Quesera San José ubicada en Chambo vía Catequilla. La concentración de grasas y aceites en sus aguas residuales es de 46 mg/L, valor que sobrepasa 0,3 mg/L que es el límite establecido por el TULSMA para descargas en fuentes naturales.

Por cada mililitro de líquido ruminal se albergan alrededor de 50. 000 millones de bacterias entre estas están las lipolíticas que tienen la capacidad de hidrolizar triglicéridos y fosfolípidos (Arias I.2011) componentes que se encuentran presentes en las grasas y aceites de la muestra de estudio.

Estudios biotecnológicos que aprovechen este tipo de residuos hacen que se encuentren nuevas alternativas como aporte a la solución de problemas ambientales como del que es objeto de este trabajo de titulación.

El desfogue de las aguas residuales producidas por la industria San José es directa al río Chambo, fuente de agua natural que se encuentra cercana a la quesera, contribuyendo así a la contaminación ya que la producción de esta industria es diaria y elevada. El río Chambo es utilizado para regar los cultivos y para el ganado lo que ha generado problemas en la comunidad ya que la producción de sus cultivos y sus animales se ha visto disminuida.

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Desde hace mucho tiempo atrás la industria láctea genera una gran cantidad de aguas residuales, este tipo de aguas posee materia orgánica, grasas y aceites, sólidos suspendidos, pH elevados, por lo que necesitan un tratamiento previo para poder ser vertidas a fuentes naturales. (Arango, O.2009, p25).

La industria ha desarrollado procesos biológicos catalizados por enzimas, debido a que poseen ventajas en comparación con los catalizadores no biológicos. (Rosales, I.2013, p11). Las lipasas son un tipo de enzimas presentes en varios organismos como por ejemplo en el líquido ruminal del ganado vacuno, estas enzimas forman parte de uno de los más importantes procesos de biocatálisis por las propiedades que presentan siendo capaces de degradar grasa (Domínguez, D.2012, p18).

Se han realizado varios estudios utilizando lipasas para la remoción de grasas en aguas residuales. Las industrias productoras de aceites han sido las que más han utilizado este tipo de procesos debido a sus excelentes resultados ya que el principal problema de estas industrias es la contaminación de sus lagunas. (Guijarro, D.2011, p11).

La remoción de grasas puede realizarse mediante la preparación de un cultivo biológico lipolítico, el cual tome las grasas presentes en el residuo, las metabolice y permita aprovechar sus nutrientes, minerales, carbohidratos y proteínas. (Guillen, C.2013, p11).

En un estudio realizado en la Plantación Palmar del Oriente (Villanueva, Casanare), se aislaron cepas nativas con actividad lipolítica de cada una de las lagunas de estabilización 1 A (14,8%); 1 B 7(24,07%); 2 (27,77%); 3 (12,96%); y 4 (20,37%). De estas cepas se seleccionaron seis, las cuales presentaron mayor actividad, tres pertenecientes al género *Pseudomonas*, una al género *Enterobacter*, otra al género *Bacillus* y otra al género *Staphylococcus*. Con las cepas aisladas se preparó un inóculo y se realizaron pruebas en campo evaluando la remoción de grasas y aceite a partir de 8 tratamientos diferentes. A todos estos ensayos se les realizaron mediciones de pH, temperatura y porcentaje de aceite y grasas. El inóculo mixto de bacterias logran remover, como máximo, el 40% del aceite en el ensayo con canecas de 60 litros en un tiempo de 15 días a una temperatura de 33°C y pH de 7,0 ± 0,2. (Martínez, C.2013,p25).

En otro estudio se aislaron bacterias halotolerantes con actividad lipolítica, para esto se recogieron varias muestras de suelos salinos y se procedió a sembrar en agar agua de sales. Se inició con una selección de 55 bacterias de morfología diferente, y se las sembró en agar de sales al 5% con tributirina y aceite de oliva al 1%. Una vez sembradas e incubadas se seleccionaron 14 cepas en base a la capacidad de hidrolisis que se observó, de estas seis fueron bacilos Gram positivos y ocho gram negativos, se pudo concluir que estas bacterias son excelentes fuentes para biotratamientos de residuos oleosos (Aguirre, E.2011,p12).

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El aprovechamiento de los residuos de origen animal es importante, ya que se podría dar uso a recursos que hasta el momento solo han sido focos de contaminación ambiental.

Debido a la falta de investigaciones, no se ha podido encontrar nuevos métodos que contribuyan a dar soluciones eficientes. Estos residuos se han convertido en generadores de contaminación, es por esto que se quiere analizar el líquido ruminal del ganado vacuno del camal de la ciudad de Riobamba.

El líquido ruminal del camal municipal de Riobamba es considerado un residuo de poco interés para aprovechamiento en sistemas de tratamiento biológico, a pesar de que diariamente se faenan cien vacas y en cada una de ellas existe cuatro litros de líquido ruminal, generándose diariamente 400 litros de este producto. Es conocido que en este tipo de residuos interactúan diversas bacterias de las cuales se conocen a las hemicelulolíticas, proteolíticas, metanogénicas y lipolíticas. (Silva, O.2010, p11)

Las funciones que realizan las bacterias del rumen del ganado vacuno son muy interesantes, puesto que ayuda al animal a degradar fibras y carbohidratos, sintetizar vitaminas, degradar ácidos grasos y componentes tóxicos de su dieta. Tomando en cuenta esto, se quiere aprovechar las propiedades que poseen las bacterias lipolíticas, ya que estas son capaces de degradar grasas del rumen de las vacas.

Las bacterias lipolíticas metabolizan los lípidos, hidrolizan triglicéridos y fosfolípidos para liberar glicerina y tres ácidos grasos, poseen diversas actividades catalíticas, se pueden obtener en gran cantidad, son económicas, se producen de forma regular, son estables y su proceso de producción es más factible y seguro debido a que los microorganismos son fáciles de cultivar por sus simples exigencias nutritivas y su tiempo de generación reducido. (Abner I.2011, p15).

El estudio de las bacterias lipolíticas existentes en el líquido ruminal es pertinente para la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental, pues se encuentra dentro de las líneas de investigación establecidas.

Por intermedio de esta investigación se pretende demostrar que este tipo de bacterias pueden ser un mecanismo eficiente para la reducción de aceites y grasas de aguas que actualmente contribuyen a la contaminación de los ríos y a su vez incide en el aprovechamiento del rumen como residuo de origen animal

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la eficiencia de las bacterias lipolíticas de rumen de vaca para la degradación de aguas residuales con grasas y aceites

Objetivos Específicos

- Aislar bacterias lipolíticas del rumen de las vacas utilizando medios de cultivos selectivos
- Acondicionar unidades experimentales para la interacción de las bacterias lipolíticas con aceites y grasas
- Determinar la capacidad degradadora de aceites y grasas de las bacterias aisladas.

CAPÍTULO I

1.2 Marco Conceptual

1.2.1. Aguas Residuales de la Industria Láctea

Las grasas y aceites principalmente se encuentran formadas por ácidos grasos, de origen animal y vegetal, dependiendo de esto se las puede clasificar en grasas animales o vegetales. Las grasas y aceites suelen estar presentes en las materias primas utilizadas por las industrias como por ejemplo la industria láctea. (Ricaurte, P.2014, p22)

Debido a esto las podemos encontrar grasas y aceites en las aguas residuales que generan las empresas debido a los diferentes procesos que realizan para obtener sus productos como quesos, quesillos etc. Frecuentemente este tipo de aguas al llegar a fuentes naturales de agua, originan varios problemas en la naturaleza, por lo que la salud del hombre se ve afectada es por esto que este tipo de aguas no pueden ser desechadas a cuerpos de aguas naturales sin un previo tratamiento. (Rivera, P.2013, p20)

Las aguas residuales contaminadas con elementos de origen lipídico, y estos al ser inmiscibles en ella se quedan en la superficie dando paso a la formación de espumas. Estas espumas interfieren en los diferentes tratamientos por lo que es muy importante que sean eliminadas. (Donoso, I.2011, p25)

Las grasas y aceites son de baja densidad, poca solubilidad, baja o nula biodegradabilidad por lo que en el agua alteran el intercambio de gases entre el agua y la atmósfera dando lugar a la reducción de oxígenos disueltos en el agua y a la perturbación en la penetración de la luz solar. (Donoso, I.2011, p26)

La presencia de grasas y aceites en el agua residual complican el transporte de los residuos por las tuberías, su eliminación en unidades de tratamiento biológico y su disposición en las aguas receptoras. (Donoso, I.2011, p28).

El principal problema ambiental que existe en la industria láctea es la producción de aguas residuales, por la carga contaminante que poseen y el volumen en que se generan. La mayor cantidad del agua utilizada en los procesos de producción de la empresa se convierte finalmente en agua residual. (Pontón, P.2000, p45).

Los procesos de la industria láctea que producen mayor contaminación, son la elaboración de quesos, cremas, mantequilla. Aproximadamente se estima que el suero utilizado en la fabricación de quesos presenta una DBO₅ de 40.000-50.000mg/L. (Pacheco, I.2000, p29).

El pH de las aguas residuales de la industria láctea por lo general es neutro o poco alcalino, aunque poseen una tendencia de que su pH se vuelva ácido, por la fermentación del azúcar de la leche generando ácido láctico, esto se puede dar por la carencia de oxígeno y la formación de ácido butírico. (Pacheco, I.2000, p22).

Las aguas residuales incluyen lactosa, sales minerales y suspensiones coloidales de proteínas como caseína, albúminas y globulinas. Aproximadamente en una industria láctea se utiliza de 8.0-3.5 L/kg de leche. El principal problema en la industria láctea es tratar el suero de quesería ya que este tiende a acidificarse rápidamente. (Torres, J.2001, p20).

Existen tratamientos de tipo biológico, en el cual se utilizan microorganismos de tipo aerobio y anaerobio, estos microorganismos llevan a cabo reacciones complejas. La aplicación de este tipo de tratamientos ayuda a disminuir la contaminación del agua, logrando que el agua llegue a los ríos lo menos contaminada posible y así evitar problemas futuros. (Rivera, P.2013, p25)

Para el tratamiento de este tipo de aguas es conveniente utilizar procesos anaerobios ya que tienen mejores resultados además de ser económicos cuando hay elevada concentración de compuestos orgánicos biodegradables. (Torres, J.2001, p24).

Algunos de los beneficios de utilizar procesos anaerobios en el tratamiento de aguas residuales son: Generación de metano que podría ser utilizado como fuente de energía, ahorro en el consumo

de energía, menor producción de fango biológico, tolerancia a elevadas cargas orgánicas. (Gavilánez, A.2007, p29).

1.2.2. Microambiente Ruminal

El rumen es un ambiente muy favorable para el crecimiento de algunos microorganismos y podría ser considerado como un medio de cultivo continuo y de gran valor para el desarrollo de microorganismos anaerobios. (Gavilánez, D.2011, p11)

Existe una entrada relativamente constante de alimentos y una mezcla continua de estos, gracias a las contracciones ruminales, que ayudan a mantener a los microorganismos en contacto con la ingesta fresca o la comida rumiada. (Gavilánez, D.2011, p13)

El pH es amortiguado por el paso de los ácidos grasos, amonio a circulación, por la entrada de grandes cantidades de saliva que contiene bicarbonato y fosfato y por la tendencia hacia el equilibrio iónico entre el contenido ruminal y el torrente sanguíneo. (Gavilánez, D.2011.p14).

La fase gaseosa del rumen está compuesta principalmente por CO₂ en un 65%, metano en un 25%, nitrógeno en un 7%. Tomando en cuentas estas condiciones un gran número de bacterias aerobias y anaerobias, protozoos podrán formar parte de este microambiente. (Barreno, I.2011.p12)

Los microorganismos que pueden desarrollarse de mejor manera en el rumen son anaerobios estrictos, organismos que suelen hidrolizar polímeros de hidratos de carbono. La densidad del líquido ruminal suele ser un poco elevada oscila entre 10¹⁰ y 10¹¹ bacterias por mililitro, en cuanto a los protozoos el número es elevado también se dice que aproximadamente existen 10⁵ y 10⁶ por mililitro. En la actualidad se han reconocido 25 especies de protozoos. (Silva, C.2012.p11)

1.2.3. Bacterias en el Rumen

La población bacteriana que existe en el rumen es muy compleja y variada se dice que existen 10 millares de bacterias por cada mililitro de líquido ruminal y la mitad de estas se encuentran en un estado muy activo. (Abner, A.2013, p11)

Algunas de las bacterias del líquido ruminal, son:

Celulolíticas:

Este tipo de bacterias hidrolizan la celulosa y metabolizan los azúcares solubles producidos. Los productos finales producido por este tipo de metabolismo es la consecuencia de varios factores tales como las propiedades físicas y químicas de los alimentos, los compuestos que se encuentran en la flora del rumen, entre las bacterias más importantes degradadoras de celulosa tenemos: *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Bacteroides succinogenes* y *Butyrivibrio fibrisolvens*. Cuando en la alimentación del animal tiene un alto porcentaje de forrajes se suele tener un gran número de bacterias celulolíticas. (Donoso, G.2009,p10).

Aminolíticas:

Entre las bacterias aminolíticas que se encuentran en el rumen tenemos: *Bacteroides amylophilus*, *Streptococcus bovis*, y *Bacteroides ruminicola Succinivibrio dextrinosolvens*. Este tipo de bacterias suelen existir en mayor proporción cuando los animales son alimentados con almidón. (Carvajal, H.2008, p12).

Lipolíticas:

Degradan sustancias que contengan grasas y aceites algunas de estas son: *Selenomona ruminantium* y *Anaerovibrio lypolítico*. (Abner, A.2011, p22).

Bacterias Hemicelulolíticas y Pectinolíticas

Entre las bacterias hemicelulolíticas mas importantes tenemos: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola* y *Ruminococcus spp.* y entre las bacterias que degradan pectina tenemos *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola* y *Lachnospira multiparus*. (Suarez, H.2014, p67).

Bacterias Proteolíticas

Según estudios realizados las bacterias proteolíticas que encontramos en el rumen son: *B. ruminicola*, algunas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Streptococcus bovis*. (Flores, J.2006, p27).

Protozoos del Rumen

Aproximadamente en el rumen existen alrededor de 10^4 y 10^6 células por mililitro de líquido ruminal. Este tipo de microorganismos son anaerobios estrictos. En su mayoría poseen cilios y flagelos, los ciliados representan a la familia *Isotrichidae* en la que se destacan los géneros *Isotricha* y *Dasytricha*. (Miguez, A.2011, p22).

Las bacterias existentes en el rumen morfológicamente pueden ser clasificadas en: cocos, bacilos, espiroquetas. Estas bacterias son capaces de vivir en un ambiente anaerobio en el cual existe CO_2 , metano y nitrógeno. El pH ideal para que estas bacterias se puedan desarrollar es de 6 a 7 a una temperatura de 30°C - 40°C . (Puga, C.2012,p77).

1.2.4. Bacterias Lipolíticas

Las bacterias lipolíticas pertenecen a un grupo de bacterias heterogéneas que generan lipasas, estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar grasas y aceites. Es común que algunas bacterias aeróbicas, anaeróbicas y proteolíticas cumplan con características lipolíticas. Entre estas tenemos *Bacillus*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y algunos mohos. (Abner, A.2011, p11).

Las enzimas de estas bacterias actúan como biocatalizadores realizando reacciones de síntesis o hidrólisis. Estas enzimas suelen ser empleadas para producir alimentos, pero al generarse diferentes problemas debido a la contaminación se las está estudiando para darles usos diferentes como por ejemplo utilizarlas en procesos de tratamientos de agua. (Durán, J.2010, p13).

A estos biocatalizadores se los puede encontrar en las bacterias ya que estas al ser fáciles de cultivar y crecen de manera rápida logrando obtener cantidades considerables de estos biocatalizadores. (Romero, S.2012, p14).

Este tipo de enzimas son muy activas en muchos sustratos, logrando efectuar reacciones de síntesis e hidrólisis. Presentan la ventaja de que son muy estables en un rango considerable de pH, aunque se desarrollan mejor en pH de tipo neutro, se consideran bacterias muy versátiles. (Abner, A.2011, p11).

Las bacterias lipolíticas para su desarrollo necesitan de algunos requerimientos como:

1.2.4.1. pH

Es un parámetro muy importante en el desarrollo de los microorganismos lipolíticos, ya que este tipo de microorganismos solo pueden reproducirse en un rango de pH de 6 a 7, fuera de este, llegan a su fase de muerte. (Robalino, S.2016, 29).

1.2.4.2. Temperatura

En el crecimiento de las bacterias la temperatura influye directamente ya que de esta dependerá su desarrollo óptimo, si las bacterias no se encuentran en el rango adecuado para crecer, estas se inhibirán rápidamente. Las bacterias lipolíticas se desarrollan en un rango de temperatura de 30 °C a 40 °C. (Cantuña, Z.2011, 13).

1.2.4.3. Nutrientes

Los microorganismos para crecer y poder realizar adecuadamente sus funciones, deben tener un ambiente de nutrientes óptimo que le brinde energía para realizar la biosíntesis, Estos organismos suelen presentar una gran diversidad fisiológica debido a esto tiene requerimientos nutricionales específicos. En el caso de las bacterias lipolíticas sus principales nutrientes son las grasas. (Cantuña, Z.2011, 13).

1.2.5. Lipasas

Las lipasas son enzimas que disgregan las grasas, la función que realizan, es hidrolizar lípidos generando ácidos grasos libres y glicerol, se las puede encontrar en varios seres vivos como por ejemplo en los bovinos. Las lipasas realizan algunas funciones entre las que tenemos quirales esto se da gracias a la posibilidad de resolver mezclas racémicas. (Ruiz, C.2011, p31).

El mecanismo catalítico de las lipasas consiste en un intercambio de cargas, este se encuentra formado por cuatro fases. Después de la unión del sustrato, se origina un ataque nucleofílico por la acción del grupo hidroxilo de la serina catalítica sobre enlace éster del lípido, lo que lleva a la rotura del enlace y a la formación de un intercambio entre el ácido graso y la serina nucleofílica. (Ruiz, C.2011, p39).

Posteriormente se libera el alcohol y se produce un segundo ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua que ataca el enlace éster del intermediario transitorio, lo que produce la liberación del ácido graso y la generación del centro catalítico”. (López, D.2010, p22).

Las lipasas actúan como una clase de enzima de rápida producción, ahora se les está dando aplicaciones muy interesantes en varias industrias como en la hidrocarbúrfica, farmacéutica. suelen ser utilizadas ambientalmente para hidrolizar grasas en residuos sólidos. (Giménez, M.2000, p19).

1.2.6. Medios de Cultivo para Bacterias Lipolíticas

1.2.6.1 Agar Tributirina

El agar tributirina es un medio de cultivo utilizado para aislar bacterias degradadoras de grasas este medio se encuentra compuesto por:

Extracto de levadura.....	3.0g
Peptona.....	5,0g
Tributirina.....	10.0g
Agar-Agar.....	15.0g

Para su preparación se coloca cada uno de sus componentes en una botella de tapa rosca con un litro de agua destilada se la cierra y se procede a agitar magnéticamente para llevarla a autoclavar, una vez autoclavado el medio está listo para ser utilizado para la siembra.

Ya que el medio es utilizado para la degradación de organismos lipolíticos, la degradación de tributirina es decir de los ácidos grasos genera halos de aclaramiento alrededor de las colonias en contraste con el resto del medio de esta manera podremos reconocer las bacterias degradadoras de grasas. (Pacheco, V.2012, p34).

1.2.6.2. Agar Lecitinasa

Esta prueba nos ayuda a conocer el nivel de degradación de los microorganismos para generar la enzima lecitinasa. El medio de cultivo se encuentra formado por:

Peptona.....	20,0g
Fosfato disódico.....	2,5g
Cloruro de sodio.....	1,0g
Solución al 0,5% p/v de sulfato de magnesio...	0,1mL
Glucosa.....	1,0g
Agar.....	12,5g
Agua destilada.....	500mL

Se procede a verter los componentes en una botella de tapa rosca con 500 mL de agua destilada, se agita magnéticamente y se autoclava el medio. El agar debe ajustarse a un pH de 7,3-7,4. Una vez que el medio se haya autoclavado se añade la yema de un huevo y se agita hasta que se note homogeneidad en la mezcla. Si el resultado es positivo aparece una zona opaca alrededor del crecimiento microbiano. (Bonifaz, D.2010, p23).

1.2.6.3. Agar Rojo Neutro

El agar rojo neutro es utilizado para identificar organismos de características lipolíticas, cuando el resultado es positivo el pH baja esto se debe a la acumulación de ácidos grasos libres, la coloración del rojo se torna brillante en los lugares donde existen ácidos grasos libres. El agar rojo neutro se encuentra formado por los siguientes compuestos: polisorbato 80, rojo neutro, caldo nutritivo, agar bacteriológico, aceite de olivo. (Páez, F.2010, p13)

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Metodología de la Investigación

2.1.1. Lugar de la Investigación

Quesera “San José”

2.1.2 Hipótesis y especificación de las variables

Hipótesis general:

Las bacterias lipolíticas del rumen de vaca reducen grasas y aceites de las aguas residuales de la quesera San José

2.1.3. Tipo y Diseño de Investigación

Esta investigación es de tipo Descriptiva, experimental, ya que se analizaron diferentes variables en condiciones determinadas, con el fin de observar y estudiar el desarrollo de la investigación.

2.1.4. Unidad de Análisis

Se trabajó con cuatro unidades experimentales. Dos fueron blancos y dos las unidades en donde se inoculó las bacterias. Todas las unidades de estudio fueron sometidas a condiciones aerobias y anaerobias con el fin de determinar el medio que permite el mejor desarrollo microbiano de mejor manera.

2.1.5. Población de Estudio

Bacterias lipolíticas del rumen de vaca del camal de la ciudad de Riobamba

Grasas y aceites de las aguas residuales de la Quesera San José

2.1.6. Tamaño de Muestra

Se trabajó con un volumen de 15 litros de agua residual para cada unidad experimental

2.1.7. Selección de muestra

Las muestras de líquido ruminal fueron tomadas del estómago de 4 vacas previamente faenadas en el camal de la ciudad de Riobamba.

Las muestras de agua residual fueron tomadas del punto de descarga de la industria láctea San José.

2.1.8. Técnicas de Recolección de Datos

Análisis de la curva de crecimiento microbiano

Análisis de parámetros físico químicos de aguas residuales: DBO₅, oxígeno disuelto, pH, grasas y aceites.

2.2. Procedimientos Realizados en el Estudio

2.2 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LAS BACTERIAS LIPOLÍTICAS DE RUMEN DE VACA PARA LA DEGRADACIÓN DE GRASAS Y ACEITES

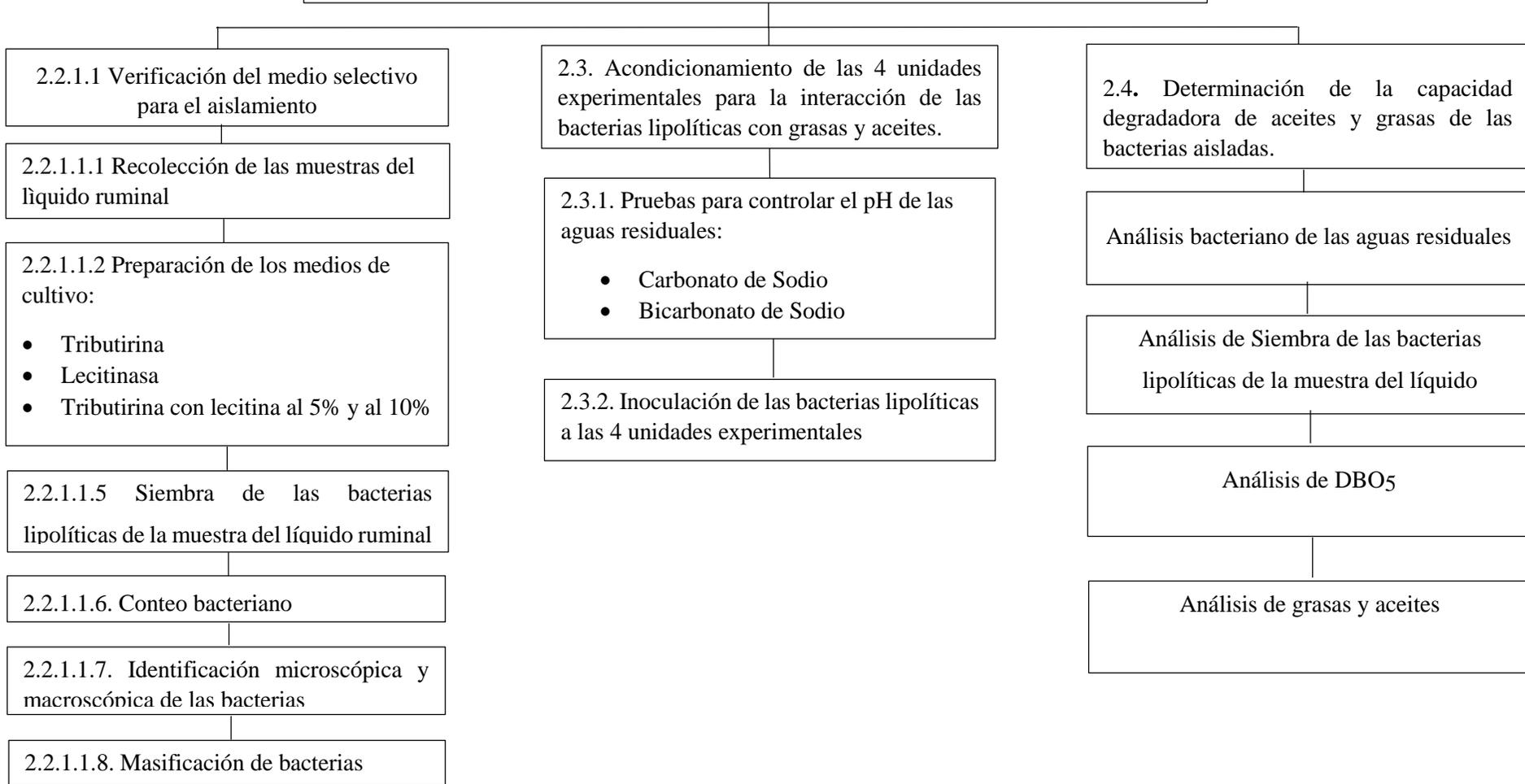


Ilustración 1-3. Gráfico de Procedimientos Realizados en el Estudio
Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

2.2.1 Evaluación de la Eficiencia de las Bacterias Lipolíticas de rumen de vaca para la Degradación de grasas y aceites.

2.2.1.1 Verificación del medio selectivo para el aislamiento

2.2.1.1.1 Recolección de las muestras de líquido ruminal

- Las muestras de líquido ruminal fueron tomadas en recipientes estériles del ganado faenado del camal de la ciudad de Riobamba ,con la colaboración de sus técnicos

2.2.1.1.2 Preparación del medio de cultivo Tributirina

- Se pesó cada uno de los componentes que forman este agar entre los que tenemos:
3g de extracto de levadura,5g de peptona,25g de mantequilla,15g de agar agar, para 1000mL de agua destilada.
- Se agitó magnéticamente hasta que se logró una mezcla homogénea, después se autoclavó el medio a 121⁰C y 1atm de presión con el fin de evitar contaminación y garantizar condiciones de asepsia.

2.2.1.1.3. Preparación del medio de cultivo Lecitinasa

- Para preparar este medio de cultivo se pesaron: 20 g de peptona, 2.5g de fosfato disódico,1g de cloruro de sodio,0.1mL de solución al 0.5% p/v de sulfato de magnesio,1g de glucosa,12.5g de agar,500mL de agua destilada.
- Luego se agitó magnéticamente hasta que se logró una mezcla homogénea, después se autoclavó el medio a 121⁰C y 1atm de presión con el fin de evitar contaminación y garantizar condiciones de asepsia.

2.2.1.1.4. Preparación de los medios de cultivo Tributirina con lecitina al 5% y al 10%

Para la preparación de estos medios, se siguió el mismo proceso del medio de cultivo tributirina, con la diferencia que aquí se añadió lecitina al 5% y al 10% .

2.2.1.1.5. Siembra de las bacterias lipolíticas de la muestra del líquido ruminal

- Para las siembras se realizaron diluciones hasta 10^{-8} , con el fin de observar de mejor manera las bacterias, ya que las muestras de líquido ruminal presentaron una gran carga microbiana.
- Se colocó 13 mL de cada uno de los medios de cultivo preparados, en ocho cajas petri y se dejó solidificar el medio.
- En la cámara de flujo laminar se sembró 1mL de cada una de las disoluciones en ocho cajas petri y una vez realizadas las siembras se procedió a cerrar y agitar las cajas para esparcir la muestra en todo el medio
- Finalmente se incubaron las cajas en aerobiosis y anaerobiosis a 37 ° C por 48h.

2.2.1.1.6. Conteo bacteriano

- Pasadas las 48 h se observó en todos los medios de cultivo empleados, halos de aclaramiento alrededor de las colonias en contraste con el resto del medio como lo indica bibliografía al respecto, lo que permitió reconocer la presencia de bacterias lipolíticas.
- Se escogieron las cajas donde se podía observar mayor cantidad de colonias y con la ayuda de un contador de colonias se determinó cuantas UFC/mL existían.

2.2.1.1.7. Identificación microscópica y macroscópica de las bacterias

2.2.1.1.7.1. Microscópica

Se realizó por Tinción Gram, para esto se seleccionaron colonias y mediante un frotis se hicieron montajes de cada una de las cajas seleccionadas, para posteriormente trasladarlas al microscopio con el fin de conocer su morfología celular.

2.2.1.1.7.2. Macroscópica

En la identificación macroscópica se tomó en consideración halos de hidrólisis, color, textura, tamaño y elevación de las colonias bacterianas.

2.2.1.1.8. Masificación de bacterias

- Se pesó 4,8 g de caldo nutritivo para 600mL de agua destilada
- Se agitó el caldo nutritivo magnéticamente hasta obtener una mezcla homogénea, se lo esterilizó a 121⁰C y 1 atm de presión para poder garantizar asepsia. Este procedimiento se lo realizó por duplicado ya que se quería incubar las bacterias en aerobiosis y anaerobiosis.
- Después de autoclavar los caldos nutritivos se trasladaron a la cámara de flujo laminar hasta que su temperatura sea ambiente.
- De las cajas del medio de cultivo tributirina, que es en el medio donde se obtuvo un mejor crecimiento de las bacterias lipolíticas, se escoge la mejor, tanto de aerobiosis como de anaerobiosis y con la ayuda de un asa se realizaron varios frotis con el fin de recolectar bacterias lipolíticas para ser masificadas.
- Una vez realizado este procedimiento se sellaron los caldos nutritivos dejándolo en incubación por 48 h.
- Se refrigeraron los caldos nutritivos para su posterior uso.

2.3. Acondicionamiento de las Unidades Experimentales para la Interacción de las bacterias Lipolíticas con grasas y aceites.

2.3.1. Pruebas para controlar el pH de las aguas residuales

El agua residual de la Industria Láctea San José, inicialmente presentó un pH ácido de 3,8. Tomando en consideración antecedentes bibliográficos, las bacterias lipolíticas crecen en un pH de 6-7, razón por la cual previo a la inoculación de las bacterias en las aguas residuales, se acondicionó el medio a través de tres pruebas que consistieron en el adición de carbonato

de sodio, bicarbonato y bicarbonato de sodio con el fin de que el pH se encuentre en los valores requeridos.

Para la verificación de las condiciones del medio, se hizo un análisis minucioso de la curva de crecimiento microbiano para con ello descartar el compuesto más agresivo para su desarrollo.

Para las soluciones de Carbonato de sodio, Bicarbonato de sodio y Bicarbonato, se prepararon soluciones al 10%, y de cada una de ellas se tomaron alícuotas de 5mL o según lo requerido hasta alcanzar el pH adecuado.

- Una vez preparadas estas soluciones se tomó 9mL de cada una y se las colocó en tubos de ensayo, adicionando 1mL de caldo nutritivo incubado en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.
- Se sellaron los tubos y se los incubó nuevamente en aerobiosis y anaerobiosis
- Después de dos y cuatro días se hizo una siembra directa en el medio de cultivo seleccionado para la diferenciación del mejor proceso.

2.3.2. Inoculación de las bacterias lipolíticas a las unidades experimentales

- Una vez escogido la solución reguladora del pH, se añadió 50mL de esta a cada una de las unidades experimentales que contenían 12L de agua residual.
- Se tomaron en consideración cuatro unidades experimentales, cada con 12L de agua residual de la industria láctea. Dos fueron blancos, a uno se lo sometió a condiciones anaerobias y al otro aerobias. En las otras dos unidades se inocularon las bacterias lipolíticas y se mantuvieron en condiciones aerobias y anaerobias, las condiciones de todas las unidades experimentales fueron de 35 °C y un pH de 6,5.
- Para su incubación se diseñó un invernadero artesanal de 1m x 1m con un foco infrarrojo que nos permitiera mantener un rango de temperatura de 35°C a 37°C.

- Se inocularon $162 \cdot 10^8$ UFC/mL de bacterias, valor considerado con base a referencias investigativas y al lapso de 13 y 28 días fue posible tomar muestras de cada una de las unidades experimentales para realizar análisis de curva de crecimiento microbiano, pH, temperatura, DBO₅, oxígeno disuelto y contenido de grasas y aceites.

2.4. Determinación de la Capacidad Degradativa de aceites y grasas de las Bacterias aisladas.

- Se realizaron análisis físico químicos como: DBO₅, pH, temperatura, DBO₅, oxígeno disuelto y contenido de grasas y aceites en el laboratorio de calidad del agua de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (VER ANEXO V)
- Se realizó un análisis microbiológico inicial en agar tributirina de las aguas residuales previo a su tratamiento para identificar organismos de naturaleza lipídica.

2.5. Análisis Estadístico

2.5.1. Diseño de Componentes principales

Se realizó un diseño de componentes principales ya que se quería conocer cuáles eran los grupos de datos que intervenían directamente con la concentración de grasas y aceites existentes en el agua residual. (VER ANEXO W)

2.5.2. Prueba de Chi-Cuadrado

Fue realizada la prueba de Chi-Cuadrado ya que se quería contrastar los valores observados con los esperados de acuerdo a la hipótesis nula. (VER ANEXO X)

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Verificación del medio selectivo para el aislamiento

3.1.1. Siembra de las bacterias lipolíticas

3.1.1.1. Medio de Cultivo Tributirina

Tabla 1-3: Crecimiento microbiano en el medio de cultivo Tributirina a 37 ° C

Disolución	Medio	Resultado log - UFC/mL
10 ⁻¹	Aerobio	7,767
10 ⁻²	Aerobio	6,812
10 ⁻³	Aerobio	5,892
10 ⁻⁴	Aerobio	4,926
10 ⁻⁵	Aerobio	3,989
10 ⁻⁶	Aerobio	0
10 ⁻⁷	Aerobio	0
10 ⁻⁸	Aerobio	0
10 ⁻¹	Anaerobio	10,863
10 ⁻²	Anaerobio	10,000
10 ⁻³	Anaerobio	9,017
10 ⁻⁴	Anaerobio	8,091
10 ⁻⁵	Anaerobio	7,135
10 ⁻⁶	Anaerobio	6,193
10 ⁻⁷	Anaerobio	5,477
10 ⁻⁸	Anaerobio	4,653

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

En esta tabla se encuentran representadas las diluciones con las que se realizó el estudio en el medio de cultivo tributirina que se utilizó para esta siembra, así como que se consideró también la temperatura y las unidades formadoras de colonia que se generaron en cada una unidad de estudio bajo condiciones aerobias y anaerobias.

3.1.1.2. Tributirina con lecitina al 5%

Tabla 3-4: Crecimiento microbiano en el medio de cultivo Tributirina con lecitina al 5% a 37^o C

Disolución	Medio	Resultado log-UFC/mL
10 ⁻¹	Aerobio	0
10 ⁻²	Aerobio	0
10 ⁻³	Aerobio	0
10 ⁻⁴	Aerobio	0
10 ⁻⁵	Aerobio	0
10 ⁻⁶	Aerobio	0
10 ⁻⁷	Aerobio	0
10 ⁻⁸	Aerobio	0
10 ⁻¹	Anaerobio	5,301
10 ⁻²	Anaerobio	4,397
10 ⁻³	Anaerobio	3,505
10 ⁻⁴	Anaerobio	0
10 ⁻⁵	Anaerobio	0
10 ⁻⁶	Anaerobio	0
10 ⁻⁷	Anaerobio	0
10 ⁻⁸	Anaerobio	0

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

En esta tabla se encuentran representadas las diluciones con las que se realizó el estudio en el medio de cultivo tributirina + lecitina al 5% que se utilizó para esta siembra, así como que se consideró también la temperatura y las unidades formadoras de colonia que se generaron en cada una unidad de estudio bajo condiciones aerobias y anaerobias.

3.1.1.3. Medio de Cultivo Tributirina con lecitina al 10%

Tabla 2-3 Crecimiento microbiano en el medio de cultivo Tributirina con lecitina al 10% a 37°C

Disolución	Medio	Resultado log-UFC/mL
10 ⁻¹	Aerobio	0
10 ⁻²	Aerobio	0
10 ⁻³	Aerobio	0
10 ⁻⁴	Aerobio	0
10 ⁻⁵	Aerobio	0
10 ⁻⁶	Aerobio	0
10 ⁻⁷	Aerobio	0
10 ⁻⁸	Aerobio	0
10 ⁻¹	Anaerobio	3,414
10 ⁻²	Anaerobio	0
10 ⁻³	Anaerobio	0
10 ⁻⁴	Anaerobio	0
10 ⁻⁵	Anaerobio	0
10 ⁻⁶	Anaerobio	0
10 ⁻⁷	Anaerobio	0
10 ⁻⁸	Anaerobio	0

Realizado por: Yadira Pazmiño ,2016

En esta tabla se encuentran representadas las diluciones con las que se realizó el estudio en el medio de cultivo tributirina + lecitina al 10% que se utilizó para esta siembra, así como que se consideró también la temperatura y las unidades formadoras de colonia que se generaron en cada una unidad de estudio bajo condiciones aerobias y anaerobias.

3.1.1.4. Medio de Cultivo Lecitinasa a 37°C

Tabla 3-3: Crecimiento microbiano en el medio de cultivo Lecitinasa

Disolución	Medio	Resultado log-UFC/mL
10 ⁻¹	Aerobio	4,511
10 ⁻²	Aerobio	3,716
10 ⁻³	Aerobio	0
10 ⁻⁴	Aerobio	0
10 ⁻⁵	Aerobio	0
10 ⁻⁶	Aerobio	0
10 ⁻⁷	Aerobio	0
10 ⁻⁸	Aerobio	0
10 ⁻¹	Anaerobio	5,511
10 ⁻²	Anaerobio	4,658
10 ⁻³	Anaerobio	3,767
10 ⁻⁴	Anaerobio	0
10 ⁻⁵	Anaerobio	0
10 ⁻⁶	Anaerobio	0
10 ⁻⁷	Anaerobio	0
10 ⁻⁸	Anaerobio	0

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

En esta tabla se encuentran representadas las diluciones con las que se realizó el estudio en el medio de cultivo lecitinasa que se utilizó para esta siembra, así como que se consideró también la temperatura y las unidades formadoras de colonia que se generaron en cada una unidad de estudio bajo condiciones aerobias y anaerobias.

3.1.1.5. Verificación de los medios de cultivo para el aislamiento (Crecimiento Microbiano)

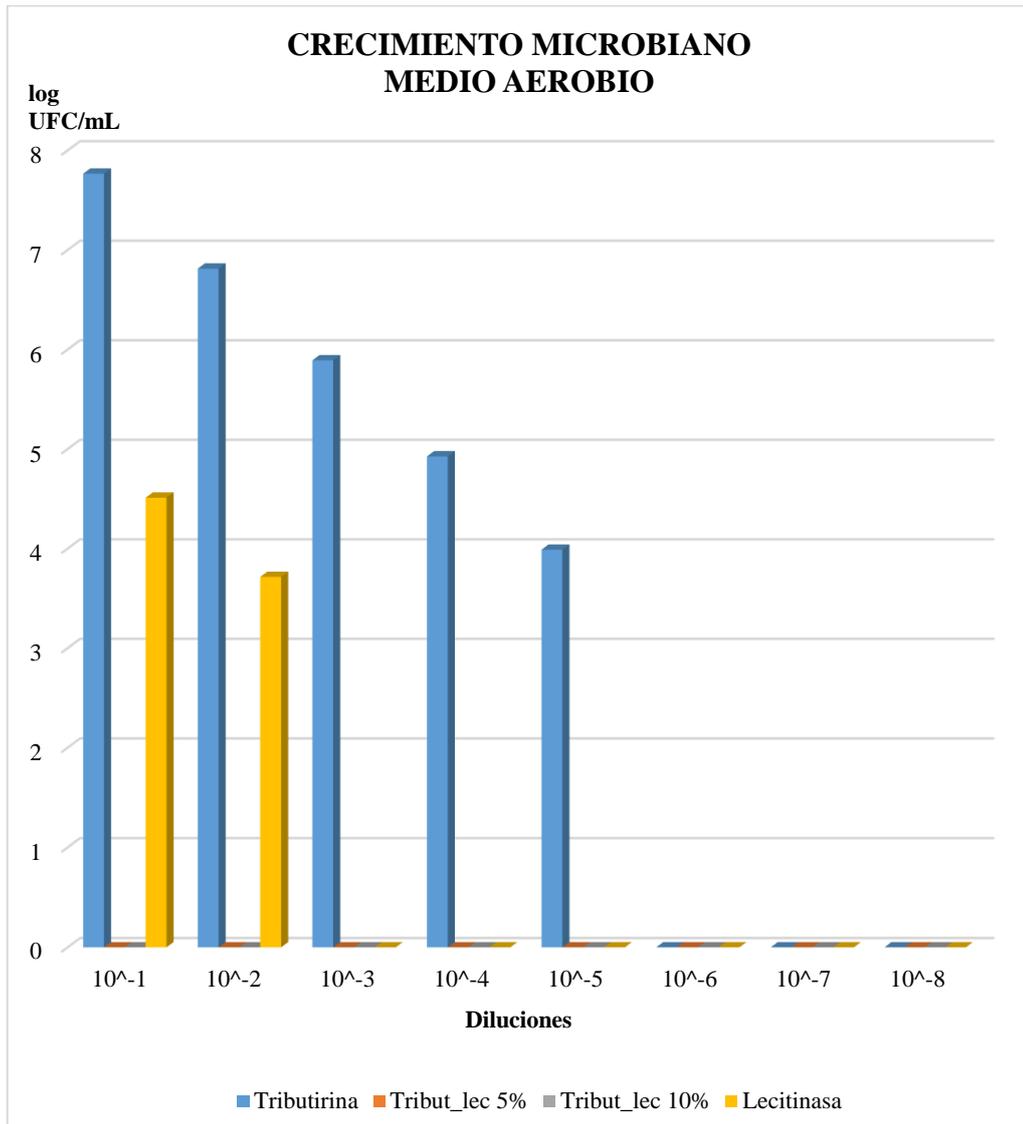


Gráfico 2-3. Crecimiento microbiano en medio aerobio

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

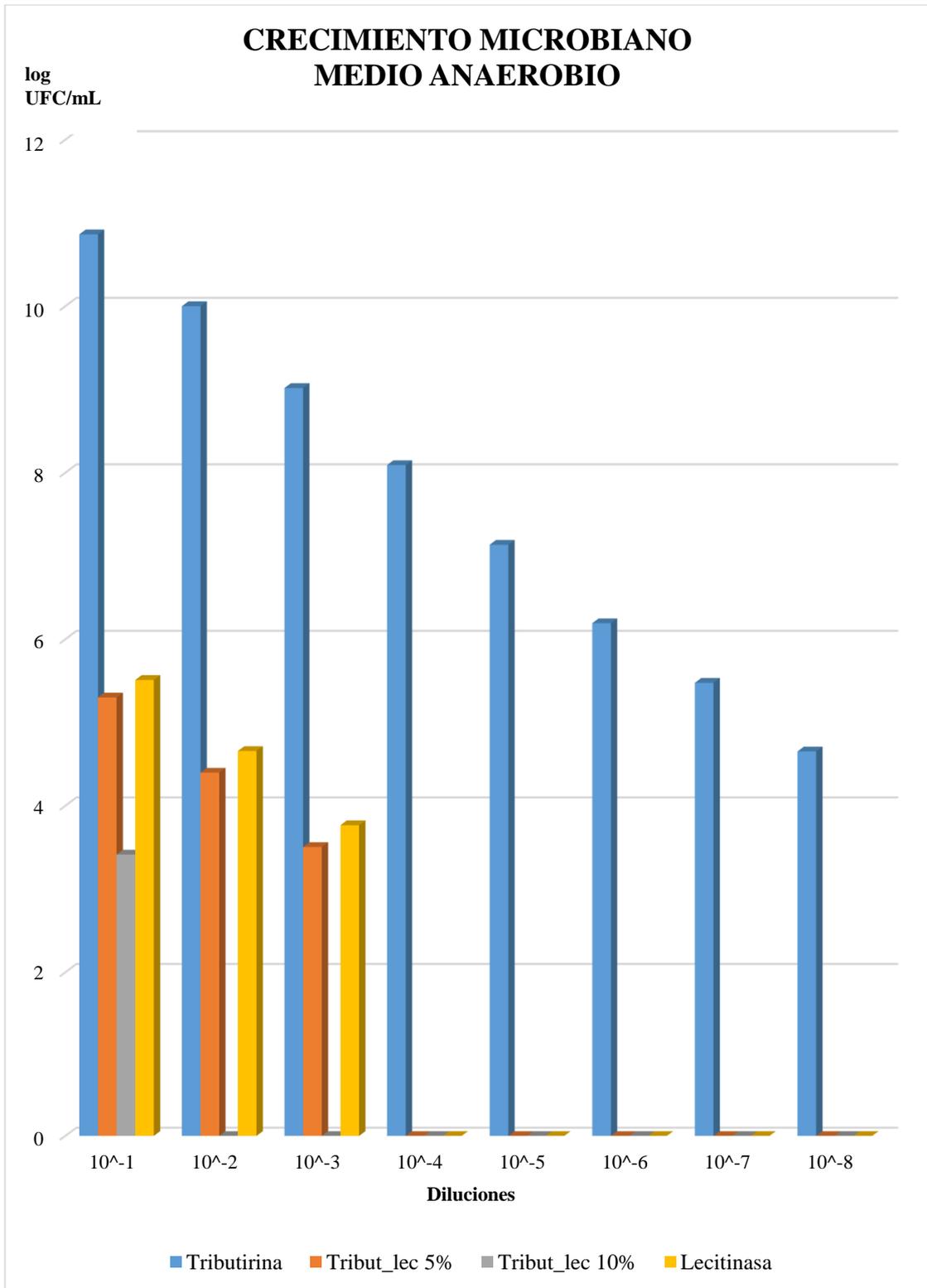


Gráfico 3-3. Crecimiento microbiano en medio anaerobio

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

Estas gráficas nos indican como se desarrollaron las bacterias lipolíticas en los diferentes medios de cultivo en disoluciones distintas, cada medio de cultivo está representado por un color diferente.

Analizando el resultado de las gráficas el mejor medio de cultivo para la siembra de bacterias lipolíticas tanto en un ambiente aerobio como anaerobio fue el medio de cultivo tributirina ya que en este medio existió crecimiento de bacterias hasta la dilución 10^{-8} (condiciones anaerobias) y 10^{-5} (condiciones aerobias.)

En el medio de cultivo lecitinasa, existió crecimiento de bacterias lipolíticas, pero en menor proporción (hasta la dilución 10^{-3}).

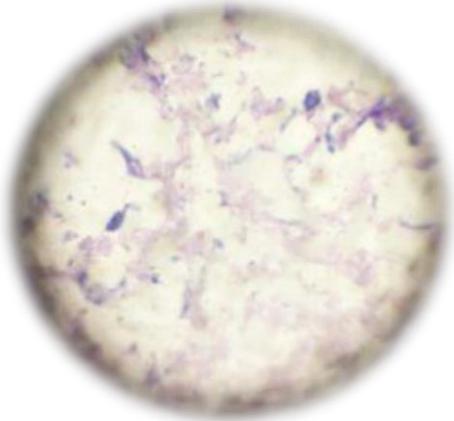
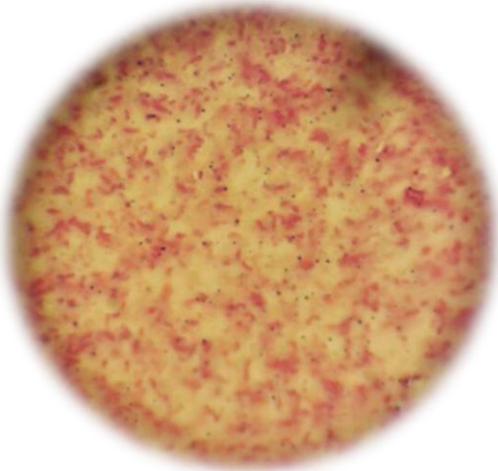
Los medios de cultivo tributirina con lecitina al 5% y al 10% fueron donde se obtuvo menor cantidad de bacterias lipolíticas. La lecitina actuó como inhibidor para el crecimiento de las bacterias, debido a esto, en el medio tributirina con lecitina al 10% fue en el que menor crecimiento de bacterias lipolíticas existió.

3.1.1.6. Identificación macroscópica y microscópica de las bacterias

Tabla 4-3: Identificación de las bacterias según la morfología

Dilución	Medio	Morfología	
		Microscópica	Macroscópica
10^{-5}	Aerobio	Bacilos gram negativos Cocobacilos gram negativos	Colonias cremosas de color amarillo
10^{-7}	Aerobio	<i>Estreptococos</i> Cocos gram positivos	Colonias cremosas de color amarillo
10^{-8}	Aerobio	<i>Staphylococcus</i> Bacilos gram negativos	Colonias rugosas de color blanco
10^{-5}	Anaerobio	Cocos gram positivos Cocos gram negativos <i>Estreptococos</i>	Colonias cremosas de color amarillo
10^{-7}	Anaerobio	<i>Estafilococos</i>	Colonias rugosas de color blanco
10^{-8}	Anaerobio	Cocobacilos gram negativos	Colonias rugosas de color blanco

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

	<p>Se puede observar levaduras y <i>Streptococcus</i> gram positivos debido a su coloración violeta</p>
	<p>La coloración rosada nos indicó la presencia de <i>Streptococcus</i> gram negativos.</p>
	<p>El color violeta nos permitió distinguir cocos gram positivos y en la mayoría <i>Streptococcus</i> gram negativos por el color rosada.</p>

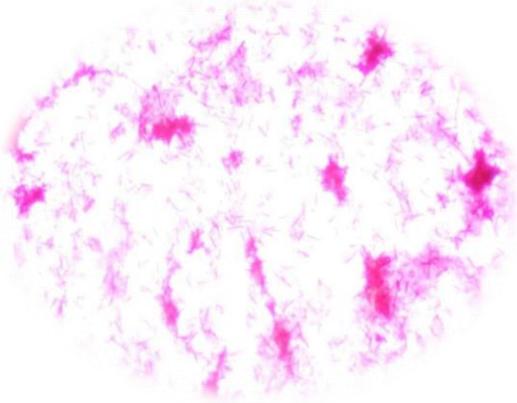
	<p>Debido a su morfología y color, en esta placa se pudo identificar bacilos gram Positivos</p>
	<p>En esta placa encontramos bacilos gram negativos por su coloracion rosada y porque tiene la forma de bastones.</p>

Figura 4-3.Identificación Microscópica

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

En las disoluciones 10^{-5} a 10^{-8} se pudo evidenciar con mayor claridad las características macroscópicas y microscópicas de las bacterias lipolíticas.

En el análisis de tinción gram para la identificación microscópica se encontraron bacilos gram negativos, cocabacilos gram negativos, cocos gram positivos, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, tanto en el medio aerobio como anaerobio.

3.2. Acondicionamiento de las unidades experimentales para la interacción de las bacterias lipolíticas con grasas y aceites.

3.2.1. Inoculación de las bacterias lipolíticas a las unidades experimentales

3.2.1.1. Desarrollo de bacterias en las unidades de análisis (in vitro)

Tabla 5-3: Crecimiento microbiano de las bacterias en las unidades de análisis

Compuesto	Cantidad (mL)	pH	Resultado log-UFC/mL
Carbonato de Sodio	5mL	6,5	8,716
Bicarbonato de Sodio	5mL 10mL 15mL	5,3 6,2 6,5	9,017
Bicarbonato	5mL 10mL 15mL	5,4 6,2 6,6	9,000

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

Para el compuesto carbonato de calcio solo se requirió 5mL, debido a que solo se necesitó esa cantidad para llegar al pH adecuado del desarrollo de las bacterias. Para el Bicarbonato de sodio se requirió 15 mL para llegar al pH adecuado del desarrollo de las bacterias y poder contabilizarlas. En el caso del Bicarbonato se requirió 15 mL para llegar al pH adecuado del desarrollo de las bacterias y poder contabilizarlas.

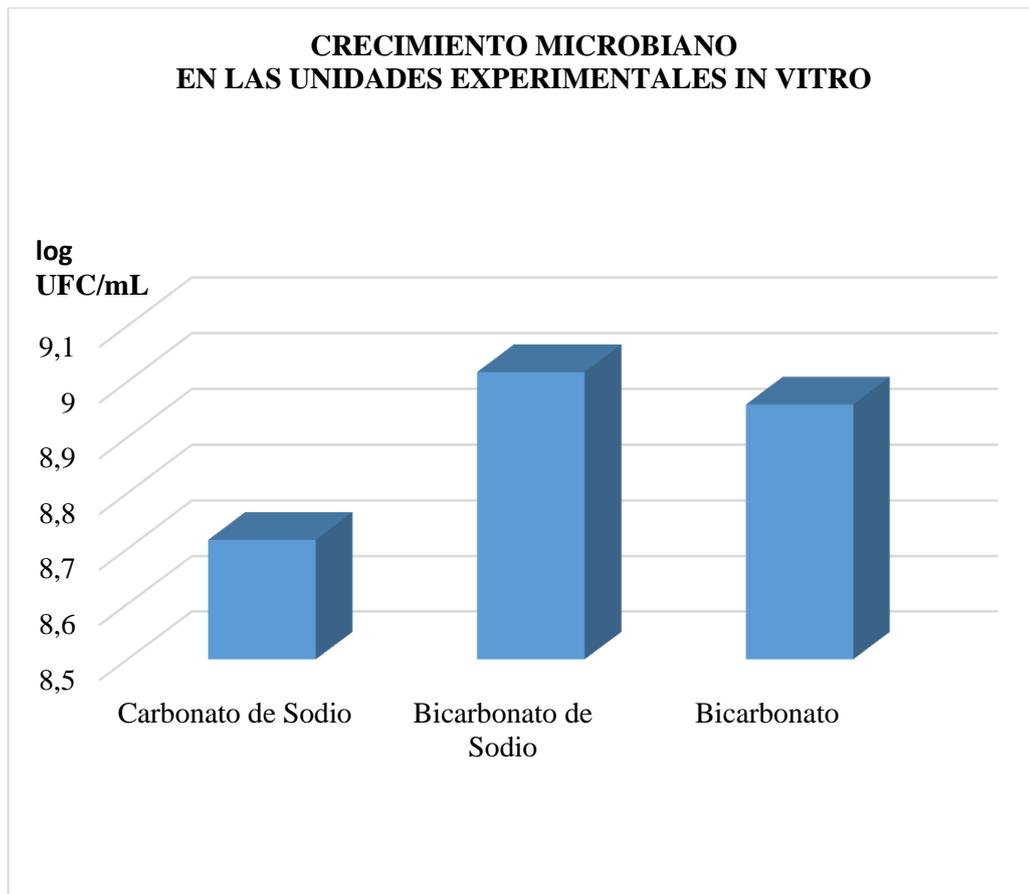


Gráfico 5-3. Crecimiento microbiano en las unidades de análisis

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

En esta gráfica se encuentran representadas las diferentes unidades de análisis en las cuales se hizo pruebas a nivel de laboratorio para elevar el pH del agua. El carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y bicarbonato, fueron los compuestos que se añadieron al agua para elevar el pH de 3,8 a un pH de 6 a 7.

Analizando los resultados de la gráfica el bicarbonato de sodio fue el compuesto menos agresivo para el desarrollo de las bacterias lipolíticas seguido del bicarbonato. Estos dos compuestos no afectaron en el desarrollo de las bacterias lipolíticas aisladas del líquido ruminal ya que el bicarbonato es un compuesto que se encuentra en la saliva de las vacas, es decir se encuentra en el medio natural donde se desarrollan estas bacterias. Por otro lado, el carbonato sí inhibió el crecimiento de las bacterias lipolíticas ya que se desarrollaron pocas colonias.

3.3. Determinación de la capacidad degradadora de aceites y grasa de las bacterias aisladas

3.3.1. Actividad de las bacterias lipolíticas en las unidades experimentales (in vivo)

Tabla 6-3: Actividad de las bacterias lipolíticas

Unidades Experimentales	Días	T (°C)	pH	DBO ₅ (mg/L)	Oxígeno disuelto (mg/L)	Grasas y aceites (mg/L)	Log-UFC/mL
Blanco aerobio	0	34	6,2	1700	0,60	46,4	2,54
	13	36	6,4	1665	0,62	46,0	3,69
	28	36	6,6	1665	0,62	46,0	0
Blanco anaerobio	0	34	6,2	1700	0,60	46,4	3,51
	13	36	6,3	1700	0,60	46,4	0
	28	36	6,1	1700	0,60	46,4	0
Aerobio	0	34	6,2	1700	0,60	46,4	10,20
	13	36	6,3	1655	0,90	45,0	11,25
	28	36	6,2	1649	1,60	44,5	9,5
Anaerobio	0	34	6,2	1700	0,60	46,4	10,20
	13	36	6,4	1245	0,67	37,0	12,00
	28	36	6,8	785	0,74	22,5	15,00

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

En esta tabla se encuentran representados los días en que se hicieron los análisis para conocer el desarrollo de la investigación. Se hicieron pruebas el día 0, 13 y 28. También se puede observar los cambios de temperatura, pH, grasas y aceites que se van dando en las diferentes etapas.

Los cambios que existieron en cuanto al OD y DBO₅

Blanco aerobio:

La DBO₅ disminuye en poca proporción y el oxígeno disuelto aumenta de manera muy baja también.

Blanco anaerobio:

La DBO₅ y el oxígeno disuelto se mantienen constantes es decir no ocurre ningún cambio en el proceso.

Aerobio:

El oxígeno disuelto aumenta y la DBO₅ baja, esto se dio a causa de la constante dotación de oxígeno en la unidad experimental.

Anaerobio:

La DBO₅ disminuyó notablemente y la concentración de oxígeno disuelto aumentó a causa de la digestión bacteriana, esto se debe a que las bacterias lipolíticas se desarrollan eficientemente en un medio anaerobio.

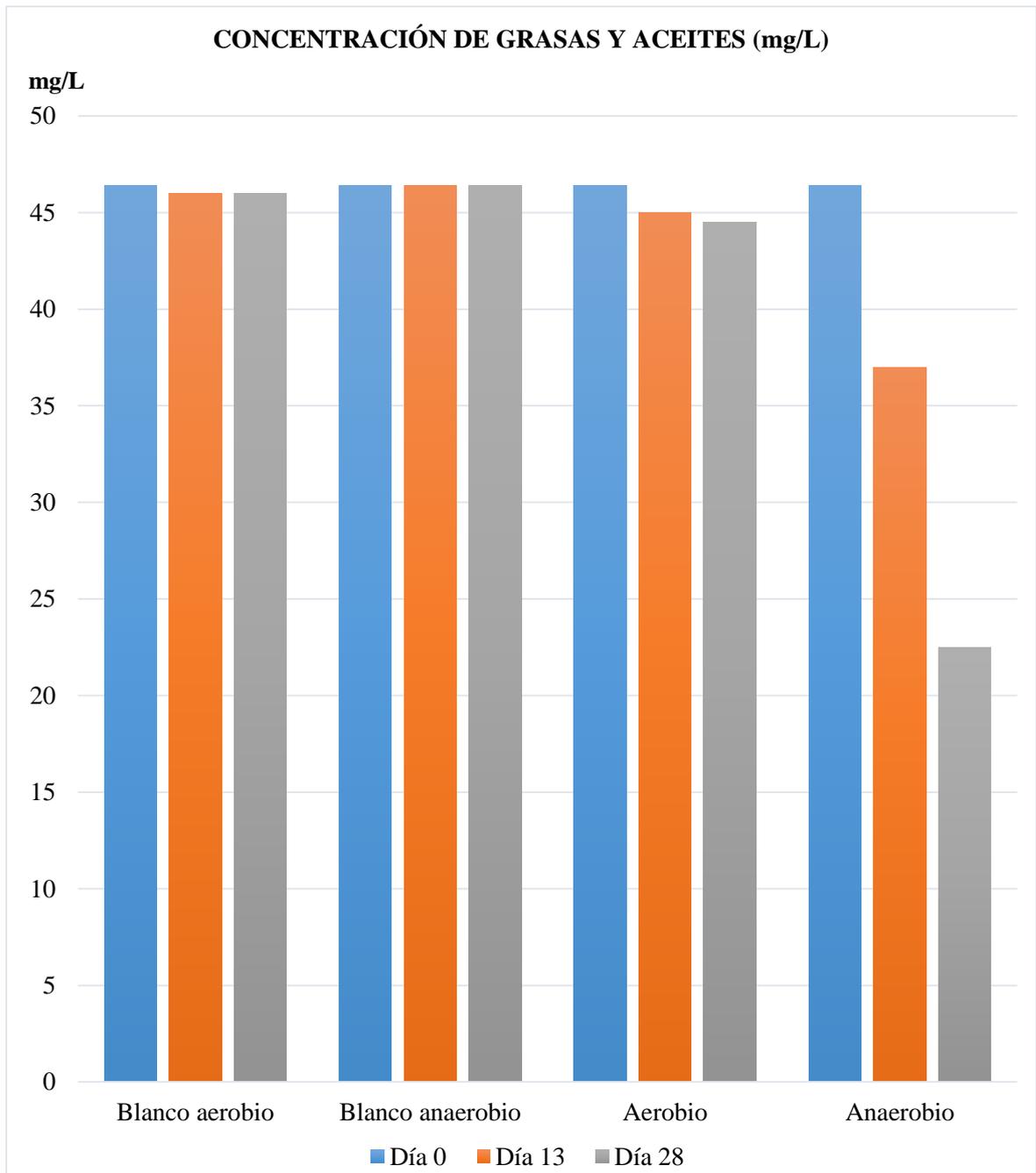


Gráfico 6-3. Concentración de Grasas y Aceites

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

Cada día está representado por un color que va desde el día 0, 13 y 28. Analizando los resultados el medio anaerobio fue el mejor para el desarrollo de las bacterias lipolíticas ya que a los 13 días disminuyó de a 46,4 a 37 mg/L y a los 28 días a 22,5mg/L.

En el medio aerobio también existió reducción de grasas y aceites, pero en menor proporción que en el anaerobio, es decir, un medio donde exista aire no será el más adecuado para el desarrollo de estas bacterias. La concentración final de grasas y aceites

en este medio fue de 44,5mg/L, valor muy lejano a la concentración final de grasas y aceites en el medio anaerobio.

En el blanco aerobio hubo reducción de grasas y aceites hasta los 13 días, y en fechas posteriores dicha concentración se mantuvo constante, esto se debe porque en un inicio se hicieron pruebas del agua residual y en ellas existían pocas colonias de *pseudomonas* que también son organismos lipolíticos, pero al añadir bicarbonato de sodio para elevar el pH estos se vieron afectados, llegando a la fase de muerte.

En el blanco anaerobio no existieron cambios en las concentraciones de grasas y aceites, se mantuvieron constantes, esto se debe a que no se agregó microorganismos lipolíticos aislados del líquido ruminal y las *pseudomonas* existentes en el agua se vieron inhibidas por el bicarbonato de sodio.

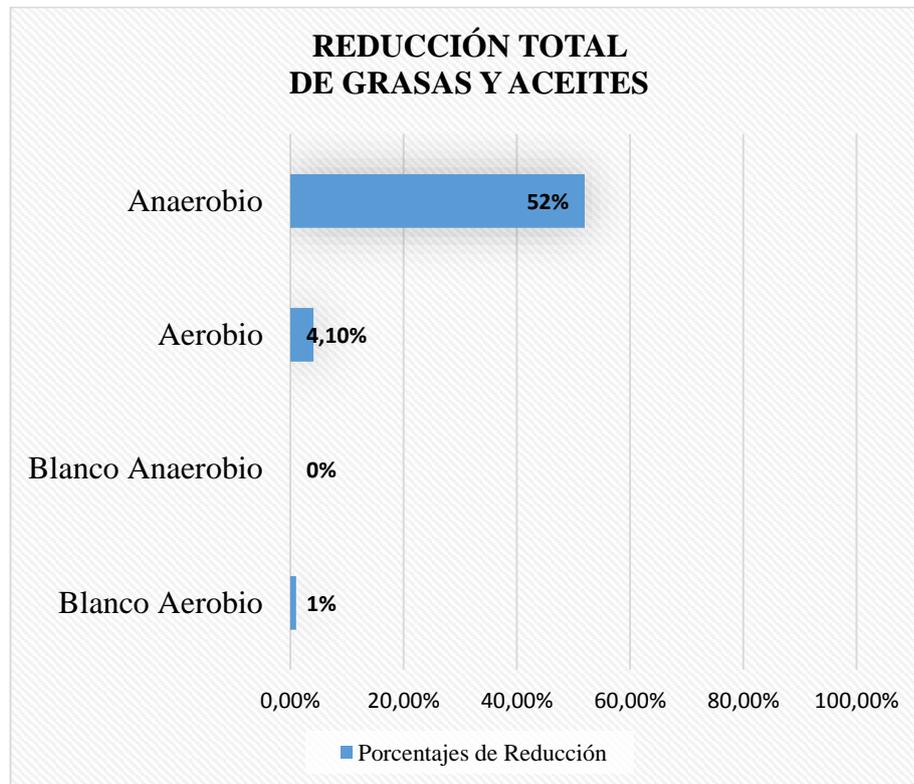


Gráfico 7-3. Porcentajes finales de reducción de grasas y aceites

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

Esta gráfica representa en porcentaje la reducción total de grasas y aceites a los 28 días. En el medio anaerobio se redujo un 52%, en el medio aerobio un 4,10%, en el blanco anaerobio se mantuvo constante la concentración de grasas y aceites y en el blanco aerobio se redujo a 1%. Es decir, el medio en el que obtuvieron mejores resultados es el medio anaerobio.

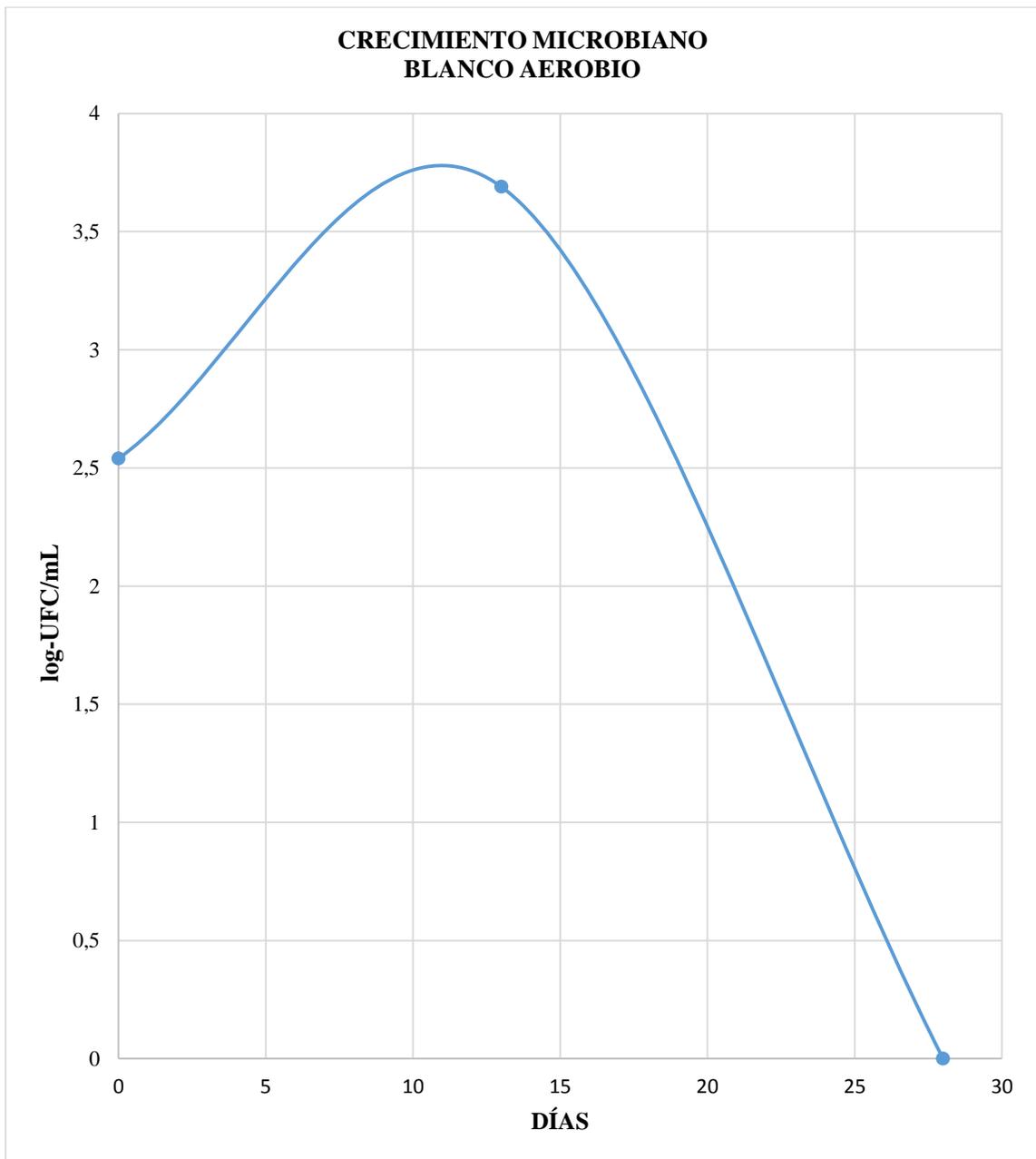


Gráfico 8-3. Crecimiento Microbiano Blanco Aerobio

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

En este medio las bacterias se desarrollaron hasta el día 13, porque al día 28 fueron inhibidas totalmente. Cabe mencionar que las bacterias que se desarrollaron en los primeros días fueron *Pseudomonas* propias del agua de muestra.

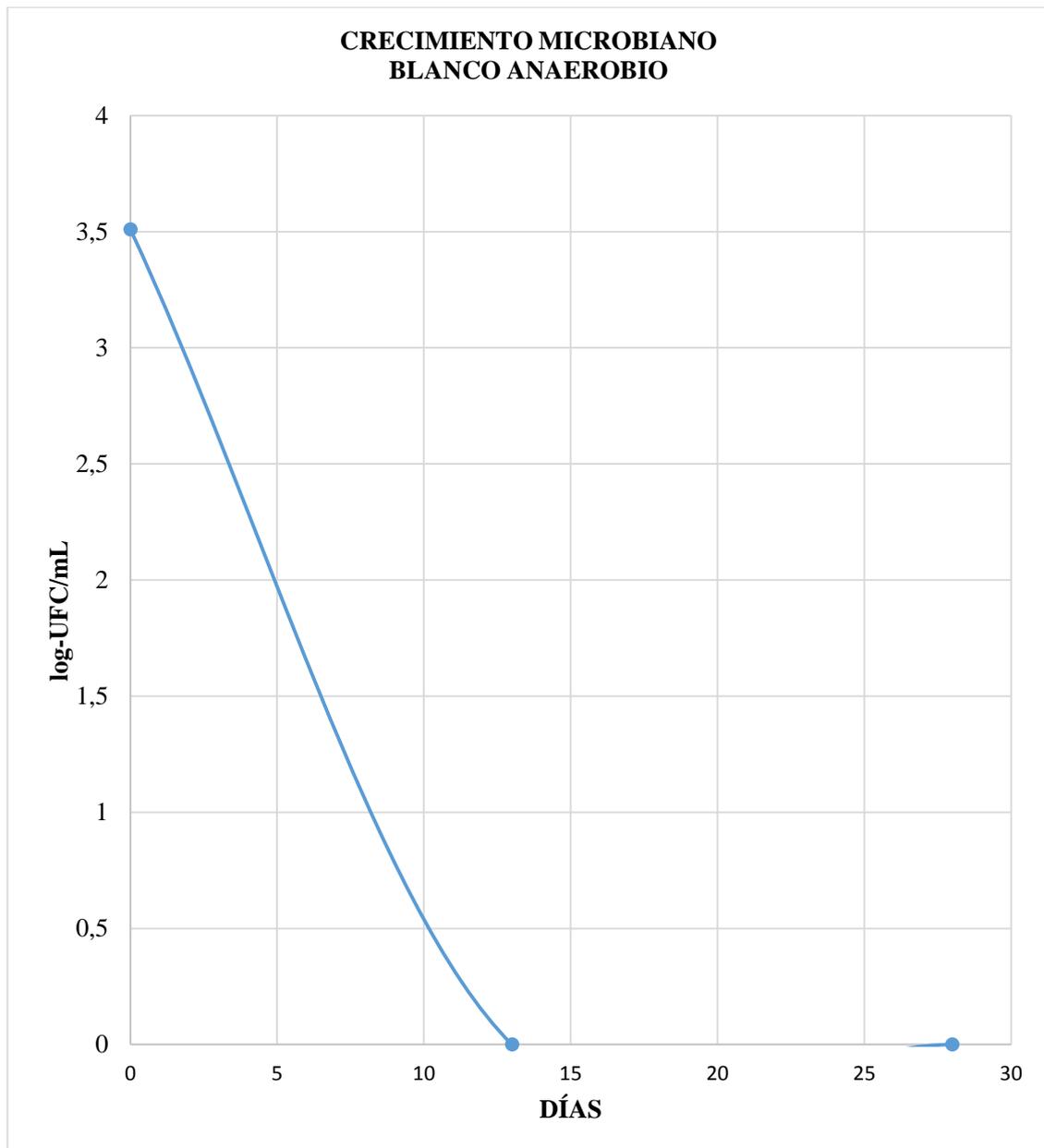


Gráfico 9-3.Crecimiento Microbiano Blanco Anaerobio

Realizado por: Yadira Pazmiño,2016

En este blanco no hubo presencia de bacterias lipolíticas en el día 13 y el día 28

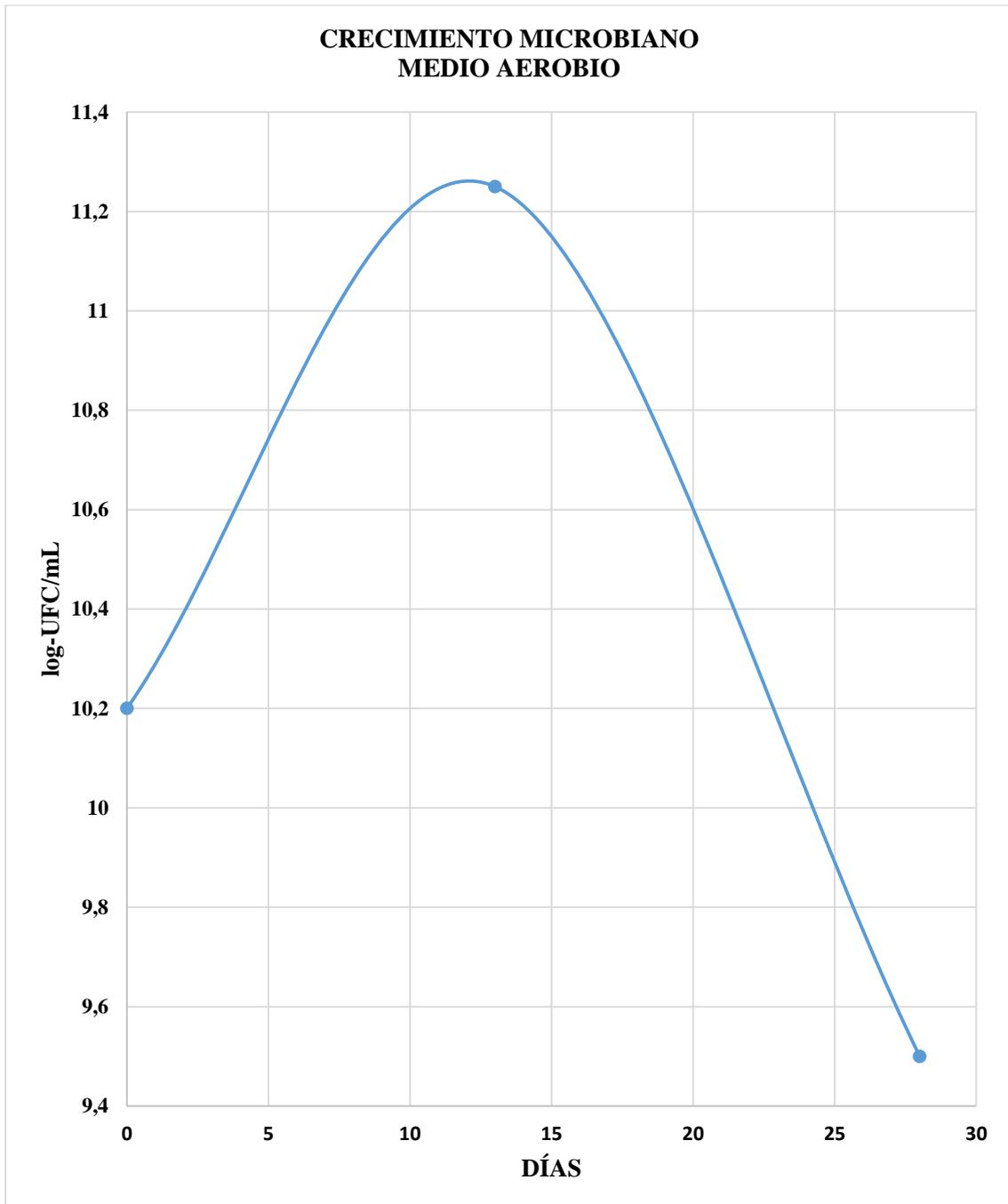


Gráfico 10-3.Crecimiento Microbiano Medio Aerobio

Realizado por: Yadira Pazmiño,2016

Dentro de la curva de crecimiento microbiana se presencié la fase exponencial hasta el día 13 luego de este día la concentración de bacterias empezó a disminuir notablemente es decir las bacterias empezaron a morir

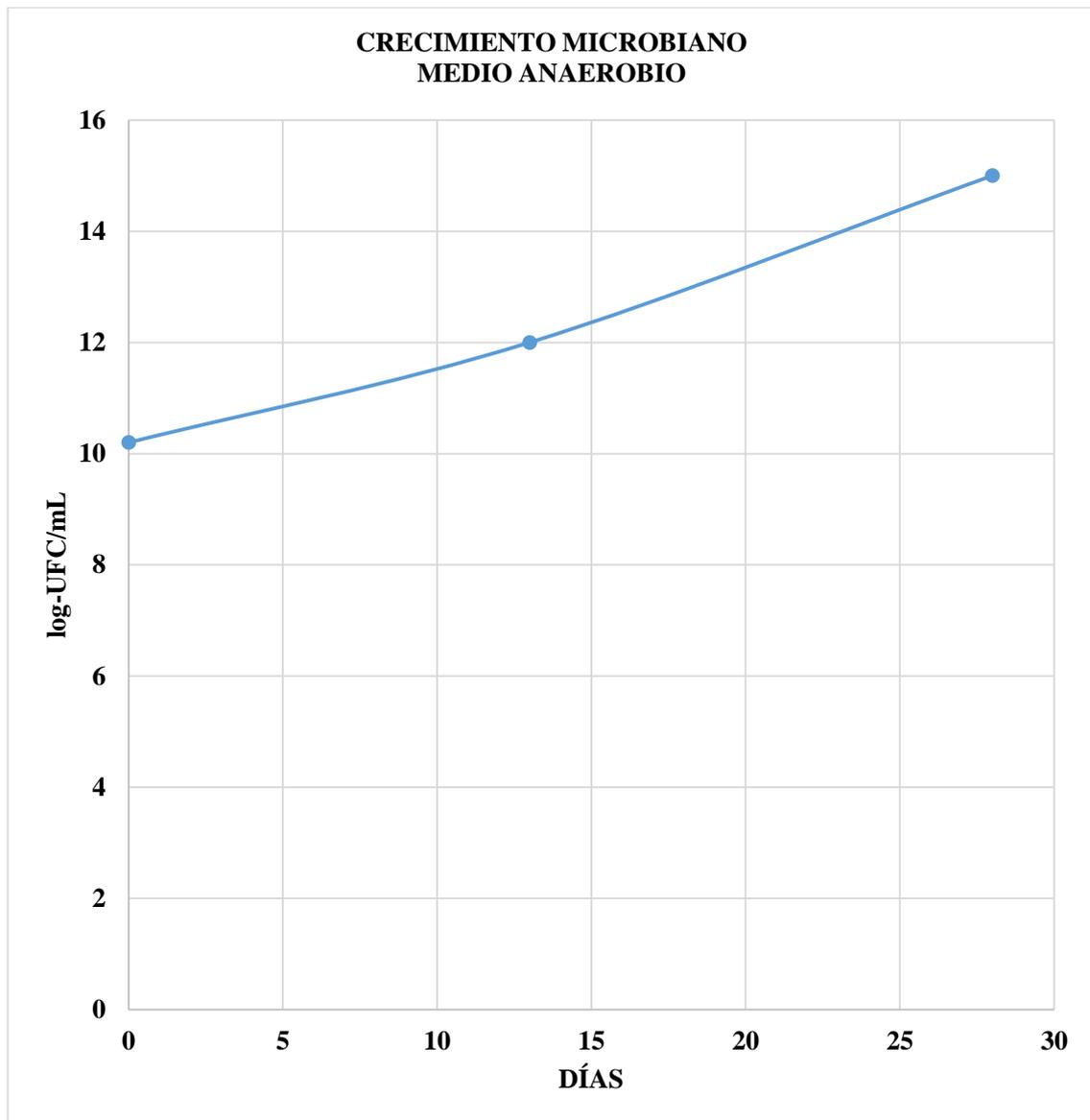


Gráfico 11-3. Crecimiento Microbiano Medio Anaerobio

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

En este tratamiento conforme va pasando los días el crecimiento de las bacterias aumenta, es decir es el mejor ambiente para el desarrollo microbiano.

3.4. Análisis estadístico

3.4.1. Diseño de Componentes principales

Tabla 7-3:Matriz de correlaciones

	T (0C)	pH	DBO ₅ (mg/L)	Oxígeno Disuelto	Grasas y aceites
Correlación	1,000	,460	-,339	,321	-,326
T (0C)					
pH	,460	1,000	-,770	-,095	-,765
DBO (mg/L)	-,339	-,770	1,000	-,035	,995
Oxígeno disuelto	,321	-,095	-,035	1,000	-,072
Grasas y aceites	-,326	-,765	,995	-,072	1,000

a. Determinante = ,002

Realizado por: Yadira Pazmiño,2016

Como el determinante es cercano a cero, se interpreta que existen correlaciones entre los parámetros.

Tabla 8-3:Prueba de KMO y Bartlett

Medida Kaiser-Meyer-Olkin de adecuación de muestreo		,546
Prueba de esfericidad de Bartlett	Aprox. Chi-cuadrado	52,619
	Gl	10
	Sig.	,000

Realizado por: Yadira Pazmiño,2016

Planteamiento de la hipótesis:

H₀: No se puede realizar el DCP $p \geq 0,05$ en la prueba de Bartlett

H₁: Se puede realizar el DCP $p < 0,05$ en la prueba de Bartlett

Decisión:

Como $p=0$ se desechó H_0 , por tanto, se puede realizar el DCP

El KMO de la ecuación muestral presenta un valor mayor a 0,5 por tanto dicha adecuación es buena

Tabla 9-3:Comunalidades

	Inicial	Extracción
T (0C)	1,000	,643
pH	1,000	,820
DBO₅ (mg/L)	1,000	,925
Oxígeno disuelto	1,000	,820
Grasas y aceites	1,000	,914

Realizado por: Yadira Pazmiño,2016

Las comunalidades de cada parámetro superan el 0,4 por tanto, cada uno de ellos es susceptible de trabajarlo en comunalidades.

Gráfico de sedimentación

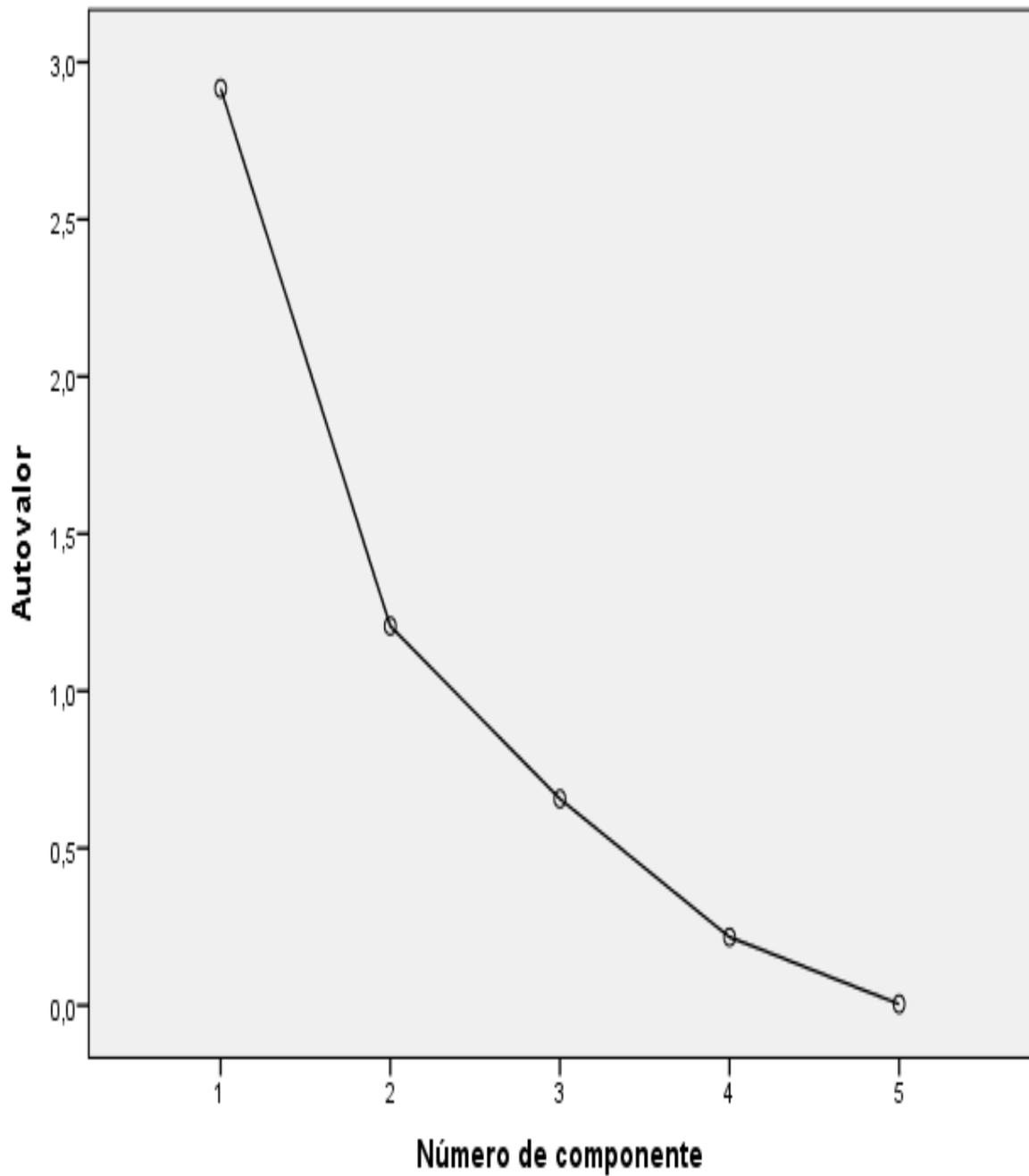


Gráfico.12-3 Sedimentación

Realizado por: Yadira Pazmiño,2016

Tabla 10-3:Matriz de componente de rotado

	Componente	
	1	2
DBO₅ (mg/L)	,958	
Grasas y aceites	,950	-,107
pH	-,904	
Oxígeno disuelto	,120	,898
T (0C)	-,403	,693

Realizado por: Yadira Pazmiño,2016

Las componentes que explican las características del agua son 2:

- 1) DBO₅, Grasas y aceites
- 2) OD, T

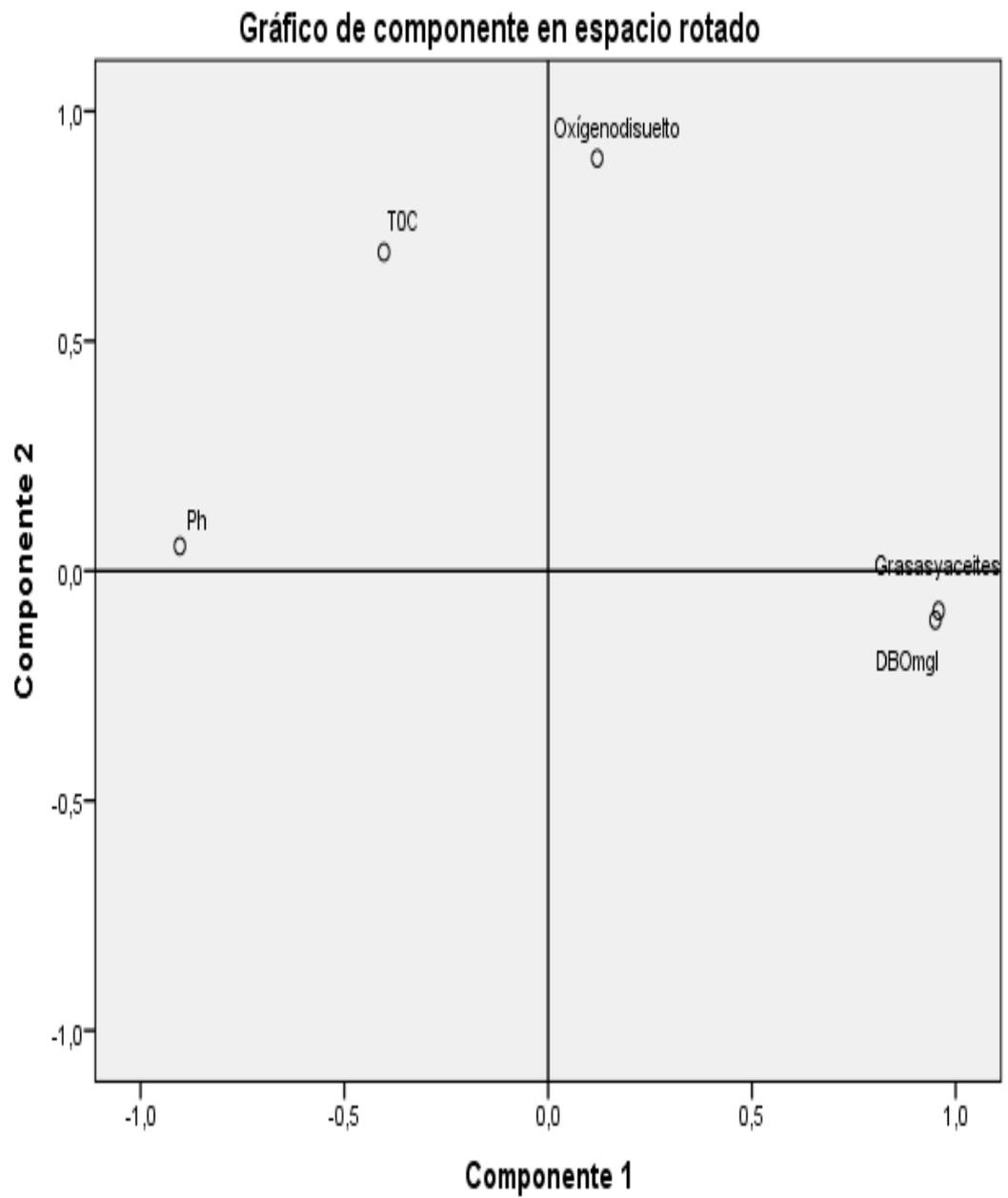


Gráfico 13-3 Componente en espacio rotado

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

Tabla 11-3:Matriz de coeficiente de puntuación de componente

	Componente	
	1	2
T (0C)	-,070	,508
pH	-,330	-,061
DBO₅ (mg/L)	,346	,041
Oxígeno disuelto	,148	,732
Grasas y aceites	,341	,024

Realizado por: Yadira Pazmiño,2016

El modelo matemático correspondiente al DCP es el siguiente:

$$Y = -0,7 X_1 T - 0,330 X_2 \text{ pH}$$

$$Y_2 = 0,508 X_1 T$$

3.4.2. Prueba de chi-cuadrado

Tabla 12-3: Prueba de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	14,000 ^a	12	,301
Razón de verosimilitud	13,183	12	,356
Asociación lineal por lineal	3,528	1	,060
N de casos válidos	12		

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

Planteamiento de hipótesis:

H₀ = Existe relación entre la concentración de grasas y aceites en el muestreo, $p \geq 0,05$

H₁ = No existe relación entre la concentración de grasas y aceites en el muestreo $p < 0,05$

Decisión:

Como p es 0,301 no existen argumentos para desechar la hipótesis nula, es decir existe relación entre la concentración de grasas y aceites en el muestreo.

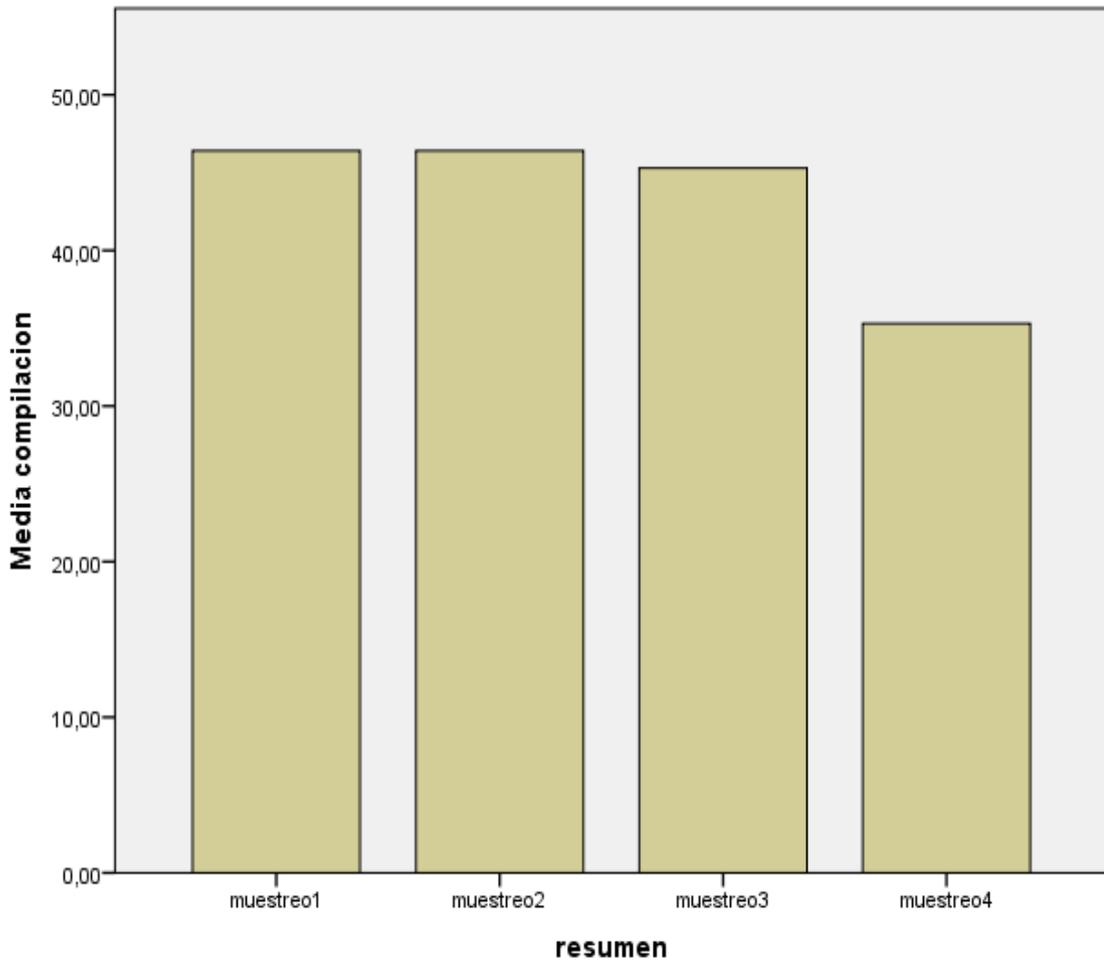


Gráfico 14-3 Compilación de datos

Realizado por: Yadira Pazmiño, 2016

En esta gráfica se encuentran representadas las concentraciones finales de grasas y aceites de las diferentes unidades experimentales. El muestreo 1 representa al blanco aerobio, el muestreo 2 al blanco anaerobio, el muestreo 3 al medio aerobio y el muestreo 4 al medio anaerobio. Analizando la gráfica el mejor medio para el desarrollo de las bacterias lipolíticas y la reducción de grasas y aceites es el medio anaerobio.

CONCLUSIONES

- El medio de cultivo selectivo más adecuado para el crecimiento de bacterias lipolíticas del rumen de vaca es la tributirina en condiciones anaerobias, pues en él se evidenció crecimiento en todas las diluciones propuestas (10^{-1} a 10^{-8}), llegando a contabilizar hasta $729 \cdot 10^8$ UFC/mL, en condiciones de aerobiosis la tributirina permitió el desarrollo microbiano hasta una dilución 10^{-5} con $584 \cdot 10^5$ UFC/mL. Con el medio de cultivo Tributirina con lecitina al 5% y al 10% las bacterias se vieron inhibidas por la lecitina pues fueron en los medios en los que menos presencia de bacterias lipolíticas existió. En cuanto al medio de cultivo lecitina se logró observar en anaerobiosis bacterias lipolíticas hasta una dilución 10^{-3} y en aerobiosis hasta 10^{-2} .
- De las cuatro unidades experimentales propuestas en el proceso metodológico, con base en la actividad lipolítica de las bacterias y su desarrollo durante la investigación las mejores condiciones para su crecimiento son las de anaerobiosis, pH de 6 a 7 para lo cual el regulador empleado más óptimo fue el Bicarbonato de Sodio, la temperatura de 30°C a 40°C , sin embargo, fue en el rango de 35°C a 37°C donde los microorganismos se reprodujeron más rápidamente.
- Según los análisis de laboratorio, la capacidad degradadora de aceites y grasas de las bacterias aisladas fue la esperada, logrando en 28 días reducir a la mitad la concentración inicial de grasas y aceites de la industria láctea, (es decir, de $46,4 \text{ mg/L}$ a $22,5 \text{ mg/L}$), este periodo de tiempo incluyó la fase de adaptabilidad de las bacterias, por lo que si se hubiese prolongado el tiempo de experimentación a dos meses bajo las mismas condiciones se podría reducir completamente la concentración de grasas y aceites de la muestra bajo los lineamientos permisibles establecidos por el TULSMA para descargas a cuerpos de agua dulce.
- La eficiencia de las bacterias lipolíticas para degradar aceites y grasas de las aguas residuales de la industria láctea fue comprobada en esta investigación, pero sobre todo se logró conseguir con ello el aprovechamiento de un residuo del canal municipal de Riobamba que (rumen de vaca) que fue realmente el proveedor de las cepas de bacterias motivo de análisis. Con ello no solamente se promueve el tratamiento biotecnológico de las aguas residuales industriales, sino que también se promueve el aprovechamiento de residuos como fuente de organismos degradadores.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda investigar otros tipos de medios de cultivo para el aislamiento de bacterias lipolíticas en los cuales también se obtenga buenos resultados.
- Realizar el estudio por más de 28 días para conocer como las bacterias continúan su desarrollo.
- Construir las unidades experimentales con vidrio
- No hacer pruebas de aerobiosis debido a que por antecedentes investigativos ya se conocía que las bacterias lipolíticas se desarrollan mejor en un medio anaerobio
- Diseñar un sistema de anaerobiosis más sofisticado para las unidades experimentales

BIBLIOGRAFÍA

- ABNER, A.** *Bacterias lipolíticas* [en línea]. Bolivia: D. Rafael,2013.[Consulta:01 de Junio del 2016]. Obtenido de <http://www.uprm.edu/ciag/inpe/ruminantia/ruminantia3-1-2008.pdf>
- ARANGO,O** “*Tratamiento de aguas residuales de la industria láctea en sistemas anaerobios tipo uasb* ”[en línea],2009,(Colombia)124(2),pp.1900-200.[Consulta:17 de Julio 2016].ISSN 1098-1208.Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n2/v7n2a04.pdf>
- ASTUDILLO, S.** *Agar Lecitinasa* [en línea]. Venezuela: L. Angel,2010. [Consulta:21 de junio del 2016]. Obtenido de http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/lecitinasa.pdf
- BANEGASP.** *Medios de cultivos selectivos*[en línea]. Colombia:M.Dario,2012.[Consulta:01 de Junio del 2016]. Obtenido de <http://www.juntadeandalucia.es/averroes/averroes/html/migracion-hosting.html>
- CAMPOS,D.** *Composición de medios* [en línea]. Perú:E.Daniel,2001.[Consulta:01 de Junio del 2016]. Obtenido de http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/curso/UNI_02/u2c2s2.htm
- DOMINGUEZ, V.** *Agar Tributirina* [en línea]. Chile: A. Francisco,2011. [Consulta:21 de junio del 2016]. Obtenido de http://www.qo.fcen.uba.ar/quimor/wp-content/uploads/2012/08/Guia_Medios_2012.pdf
- DONOSO,H.** *Técnica de Siembra de Bacterias*[en línea].Venezuela :R.Ruan,2010.[Consulta:02 de Junio del 2016]. Obtenido de <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema%2002.-%20Cultivo%20de%20microorganismos.pdf>
- DONOSO,I..** *Biocatalizadores*[en línea]. Mexico:H.Pedro,2011.[Consulta:12 de Mayo del 2016]. Obtenido de http://www.maristasgranada.net/webcole/documentos/Ciencias/Bach-1%BA/Biologia/2_Bioquimica/Biocatalizadores.pdf
- GARCES,F** “*Tratamiento de aguas residuales de la industria láctea*”[en línea],2009,(México)100(2),pp.1800-210.[Consulta:17 de Julio 2016].ISSN 1088-1108.

http://www.lasallista.edu.co/xcul/media/pdf/RevistaLimpia/vol2n2/PL_V2N2_2330_el electrocoagulaci%C3%B3n.pdf

GAVILANEZ, A. *Evaluación de la actividad lipolítica de microorganismos aislados de suelos del parque natural nacional (pnn) los nevados.* (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Carrera Microbiología Industrial, Medellín, Colombia. 2007, pp. 13 [Consulta: 12 Junio 2016]. Disponible en: <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8715/1/tesis659.pdf>

GONZALES, E. *Bacterias en el rumen* [en línea]. Perú: A. Ximena, 1999. [Consulta: 13 de Junio del 2016]. Obtenido de <http://www.ugr.es/~cjl/rumen.pdf>

GUERRERO, A. *Aislamiento de Bacterias* [en línea]. Colombia: O. Fabián, 2001. [Consulta: 11 de Junio del 2016]. Obtenido de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1506/14/UPS-CT002062.pdf>

NORIEGA, M. *Aplicaciones Biotecnológicas* [en línea]. Colombia: R. Alex, 2013. [Consulta: 18 de Junio del 2016]. Obtenido de <http://es.slideshare.net/lobezno81/biotecnologia-ambiental-i>

NOVILLO, G. *Condiciones de cultivo* [en línea]. México: A. Gabriela, 2013. [Consulta: 01 de Junio del 2016]. Obtenido de <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>

PACHECO, U. *Tratamiento Aguas Residuales de la Industria Láctea* [en línea]. España: L. Alex, 2000. [Consulta: 04 de Junio del 2016]. Obtenido de http://api.eoi.es/api_v1_dev.pHp/fedora/asset/eoi:48159/componente48157.pdf

PONTÓN, P. *Industria Láctea* [en línea]. Perú: O. Gonzalo, 2006. [Consulta: 11 de Mayo del 2016]. Obtenido de http://www.lasallista.edu.co/xcul/media/pdf/RevistaLimpia/vol2n2/PL_V2N2_23-30_electrocoagulaci%C3%B3n.pdf

PUGA, C. *Bacterias en el rumen* [en línea]. Argentina: S. Lorena, 2012. [Consulta: 13 de junio del 2016]. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.pHp?pid=S086403942009000400009&script=sci_arttext

QUINTANA, J. *Biotecnología Ambiental* [en línea]. Italia: A. Luis, 2004. [Consulta: 16 de junio del 2016]. Obtenido de http://economia.gencat.cat/web/.content/70_economia_catalana/arxiu/ne-97-98_e_blanch.pdf

- RAMOS, G.** *Aguas Residuales de la Industria Láctea* [en línea]. México DF, México: Progreso, S.A, 2003. [Consulta: 19 Junio 2016]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/aidis12/tratamiento.pdf>
- REGUEIRO, M.** *Digestión retículo del rumen* [en línea]. Venezuela: A. David, 2006. [Consulta: 05 de Junio del 2016]. Obtenido de <http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/AFA/TEORICOS/Repartido-Digestion-en-Reticulo-Rumen.pdf>
- RIVERA, N.** *Bacterias Ruminales* [en línea]. Perú: I. Dolores, 2001. [Consulta: 01 de Junio del 2016]. Obtenido de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/69bacterias_ruminales.pdf
- RODRIGUEZ, E.** *Técnicas de Identificación de bacterias* [en línea]. México: C. Jairo, 2009. [Consulta: 13 de Junio del 2016]. Obtenido de <http://es.slideshare.net/BenRivSil/proceso-tincin-de-gram-15572755>
- ROMERO, I.** *Biología y sus aplicaciones* [en línea]. México: L. Pedro, 2011. [Consulta: 12 de Mayo del 2016]. Obtenido de <http://biotecnologiaequipo5.blogspot.com/p/puto-chavarria-corrige-esto-xq-aki-va.html>
- ROSALES, A.** *Biología y sus usos* [en línea]. España: A. Miguel, 2001. [Consulta: 02 de Mayo del 2016]. Obtenido de <http://biotecnologiaequipo5.blogspot.com/p/puto-chavarria-corrige-esto-xq-aki-va.html>
- RUIZ, C.** *Lipasas y sus Aplicaciones* [en línea]. México: I. Paolo, 2011. [Consulta: 10 de Mayo del 2016]. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiyEstructuraBacteriana.pdf>
- TORRES, J.** *Vértido de aguas Residuales de la Industria Láctea* [en línea]. Perú: A. Soila, 2001. [Consulta: 22 de Junio del 2016]. Obtenido de <http://www.insacan.org/racvao/anales/1995/articulos/08-1995-02.pdf>
- VEGA, R.** *Bacterias y sus Aplicaciones* [en línea]. Argentina: A. Rafael, 2013. [Consulta: 01 de Junio del 2016]. Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>
- VEINTIMILLA, M.** *Biología y sus avances* [en línea]. Chile: A. David, 2011. [Consulta: 14 de Junio del 2016]. Obtenido de http://api.eoi.es/api_v1_dev.pHp/fedora/asset/eoi:48159/componente48157.pdf

VERDEZOTO,V. *Biotecnología Ambiental y sus Aplicaciones en el Ambiente* [en línea]. Cuba:I.Felipe,2000.[Consulta:11 de Julio del 2016]. Obtenido de <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/4233/12.ACC.Biotecnolog%C3%ADa%20Ambiental.pdf?sequence=1>

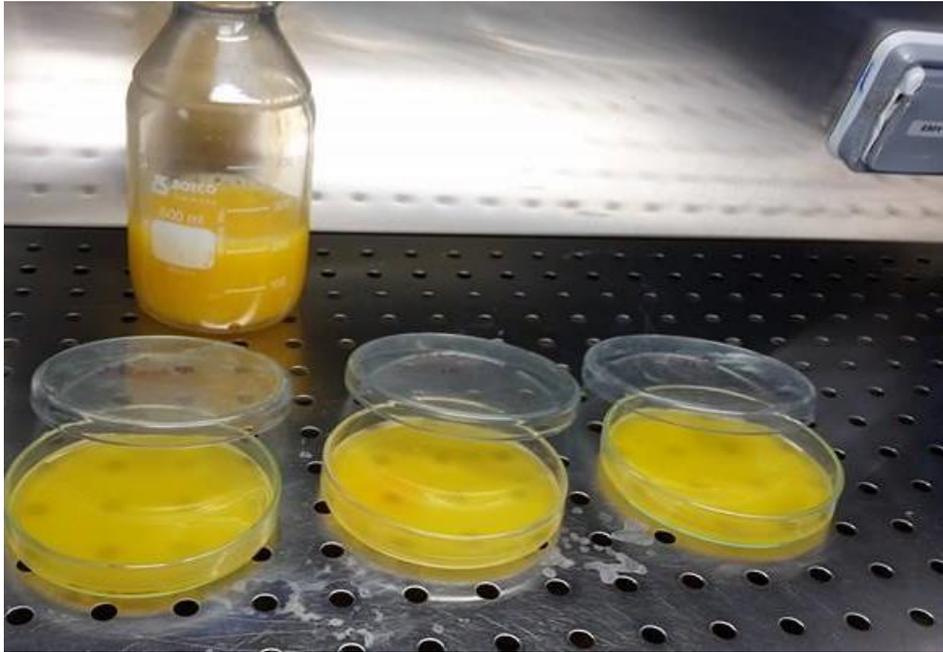
WIBLBRETT, Gerard. *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. Zaragoza : Acribia, 2000. 349 p.

ANEXOS

Anexo A. Toma de muestras - Lugar camal de la ciudad de Riobamba



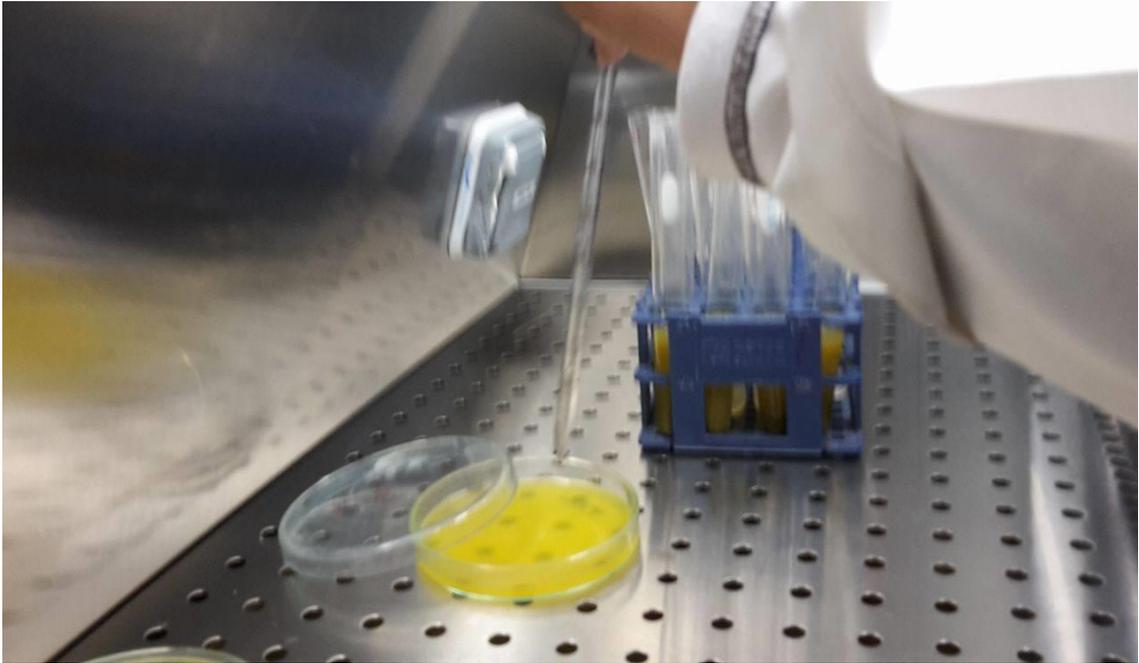
Anexo B. Medio de cultivo Lecitinasas



Anexo C. Medio de cultivo Tributirina



Anexo D. Siembra de bacterias



Anexo E. Incubación de bacterias



Anexo F. Halos de aclaramiento alrededor de las colonias dilución 10^{-8} –Anaerobio



Anexo G. Halos de aclaramiento alrededor de las colonias dilución 10^{-5} -Aerobio



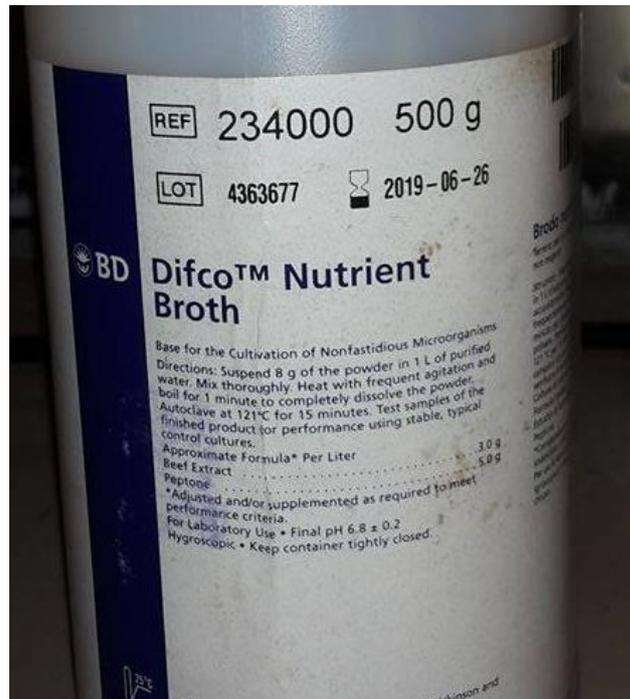
Anexo H. Reactivos utilizados para la tinción gram



Anexo I. Tinción Gram



Anexo J. Caldo nutritivo para masificación de bacterias



Anexo K. Bacterias Masificadas



Anexo L. Invernadero casero para la incubación de las bacterias



Anexo M. Corrección de pH



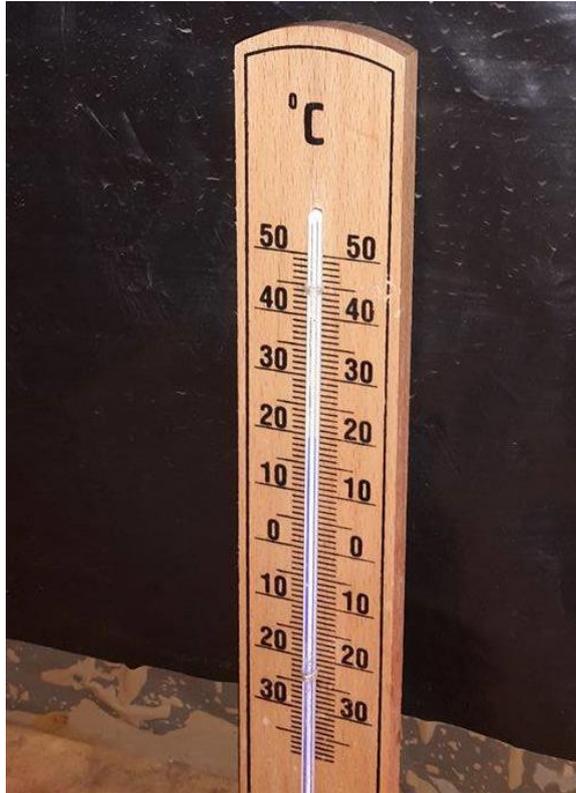
Anexo N . Inoculación de bacterias



Anexo Ñ. Unidades Experimentales listas para incubación



Anexo O. Medición de temperatura



Anexo P. Digestores para medición de DBO₅



Anexo Q. Reactivos utilizados para medición de Oxígeno disuelto



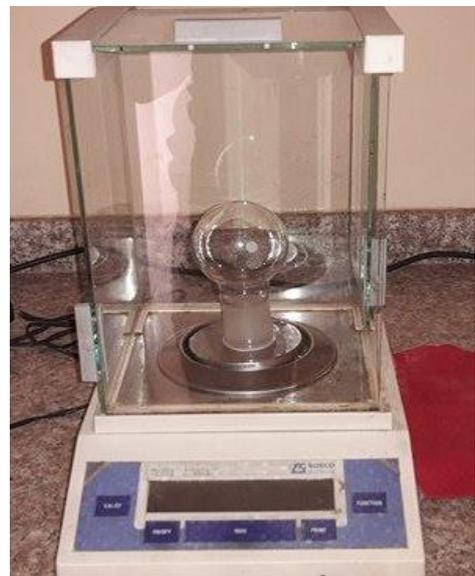
Anexo R. Materiales utilizados para la determinación de la concentración de grasas y aceites



Balón utilizado para la recolección de grasa



Equipo de destilación



Pesaje del balón

Anexo S. Contador de colonias (LABIMA ESPOCH)



Anexo T. TÉCNICAS DE SIEMBRA DE BACTERIAS

<p>Método de siembra por estría en placa</p>	<p>Este es el método más usado para obtener cultivos axénicos. Para esto se utiliza un asa que permite recoger una población mixta del cultivo para poder realizar estrías sobre la superficie de un medio sólido. A medida que se van realizando el estriado se van colocando más microorganismos en el medio. Después de esto se flamea el asa y se repite el proceso. A continuación, las placas se incuban. (Gonzales, B.2000, p14)</p>
<p>Método de vertido en placa y extensión en placa</p>	<p>Para la realización de estos métodos, se realizan diluciones de las muestras ya que estas poseen demasiados microorganismos para que la dilución no se puede realizar en una sola fase debido a esto se realizan diluciones seriadas normal mente de diez en diez, pero muchas veces de cien en cien. (Donoso, H.2010,p9)</p>
<p>Método de vertido en placa</p>	<p>En este método las muestras diluidas se mezclan con agar fundido y se vierten en placa, muchas de estas colonias se quedarán incrustadas en el agar y las demás se desarrollarán en la superficie. Las colonias que se hayan quedado en la superficie se extenderán. (Donoso, H.2010, p12)</p> <p>En este método las muestras diluidas se mezclan con agar fundido y se vierten en placa, muchas de estas colonias se quedarán incrustadas en el agar y las demás se desarrollarán en la superficie. Las colonias que se hayan quedado en la superficie se extenderán. (Donoso, H.2010, p12)</p>

<p>Método de extensión en placa</p>	<p>Las muestras diluidas se siembran directamente en la superficie de la placa de agar, se las extiende con un asa extendiéndolas con ayuda de un asa. En las dos técnicas se incuban hasta la generación de colonias. Esta técnica tiene la ventaja ya que se puede obtener un mayor número de colonias aisladas que el método de siembra por estrías es por esto que se lo elige cuando se quiere obtener una cepa de una muestra con varias variedades de microorganismos. (Palacios, B.2011,p16)</p>
--	--

Anexo U. TÉCNICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

<p style="text-align: center;">Macroscópica</p>	<p>Se realiza este tipo de identificación ya que debido a su costo son los más accesibles. Los métodos genotípicos suelen utilizarse cuando no se pueden identificar las bacterias por los métodos tradicionales. (Rodríguez, E.2010,p19)</p>
<p style="text-align: center;">Microscópica Tinción Gram</p>	<p>Es un tipo de tinción diferencial que se utiliza en la bacteriología, esta técnica hace una diferenciación por color, si son gram positivas se tornara un color morado y si son gram negativas se observará un color rosa. (Barreno, I.2010, p11)</p> <p>El cristal violeta se impregnará en todas las células bacterianas positivas como negativas. El lugol es un compuesto formado con yodo, yoduro de potasio y sulfuro, lo que estos hacen es fijar el cristal violeta de forma más profunda a la pared celular de las bacterias. (Barreno, I.2010, p11)</p> <p>El alcohol-cetona que se añade, para lograr una decoloración. (Barreno, I.2010, p13)</p>

Anexo V. TÉCNICAS PARA ANALIZAR PARÁMETROS DE CALIDAD DEL AGUA

<p>Análisis de Oxígeno disuelto</p>	<p>Se repartieron en vasos de Wheaton las muestras a analizar hasta que rebasaron los frascos, en cada uno se añadió 1mL de $MnSO_4$, 1m de Azida Sódica, se dejó reposar hasta que precipite el complejo de $Mn(OH)$, luego se agitó hasta formar el precipitado, esto es equivalente a la cantidad de O_2, presente en la muestra. Se procedió a agregar 2mL de H_2SO_4 concentrado y a agitar hasta disolver el precipitado.</p> <p>A estas muestras se las vació en un Erlenmeyer de 500mL, y se procedió a titular con Tiosulfato de Sodio 0.025N, la muestra pasó de color amarillo a amarillo pálido, se agregó un indicador de almidón y este tomó una coloración azulada, se siguió titulando con Tiosulfato de sodio hasta que se volvió transparente y se procedió anotar el volumen total de Tiosulfato de sodio utilizado.</p> <p>Cálculos del oxígeno disuelto:</p> $OD = \frac{V_{ts} * N_{tiosulfato\ de\ sodio} * Eq. O}{V_b}$ <p>Dónde:</p> <p>OD = Oxígeno disuelto</p> <p>V_{ts} = Volumen de Tiosulfato de sodio utilizado</p> <p>N = Normalidad del tiosulfato de Sodio</p> <p>Eq = Equivalente del oxígeno</p> <p>V_b = Volumen de la botella</p>
--	---

<p style="text-align: center;">Análisis de DBO₅</p>	<p>Para conocer la DBO₅ se tomaron 100mL de la muestra a analizar y se los puso en una botella color ámbar, luego se añadió un agitador magnético con el fin de crear un campo magnético rotatorio.</p> <p>Se agregó cinco gotas de inhibidor de nitrificación y se procedió a colocar un recipiente de caucho en el pico de la botella, se adicionaron tres pastillas de hidróxido de sodio, seguidamente se tapó la botella con el cabezal y se la coloco en el digestor de DBO₅. Se esperaron 5 días para obtener resultados, aunque todos los días se hizo un control de estos.</p>
<p style="text-align: center;">Análisis de grasas y aceites</p>	<p>Para este análisis se utilizó un embudo de separación al cual se le añadió 100mL de la muestra y 10mL de hexano, luego se procedió agitarlo varias veces liberando los gases que se formaban, este procedimiento se repitió un par de veces.</p> <p>Una vez agitado se dejó reposar el embudo de separación y después de un tiempo se observaron dos fases, se abrió la válvula del embudo y se dejó caer en un vaso de precipitación la fase que no contenía hexano para luego recoger en un balón la fase que contenía hexano esto se repitió por dos veces.</p> <p>La cantidad de hexano recogida en el balón se la sometió a un proceso de destilación, se dejó secar el balón por completo para obtener solo las grasas presentes.</p> <p>Cálculos:</p> $CG = \frac{Pbg - Pbv}{Vemb}$ <p>Dónde:</p> <p>CG = Concentración de grasas y aceites</p> <p>Pbg = Peso de balón con grasa</p> <p>Pbv = Peso del balón vacío</p> <p>Vemb = Volumen del embudo de separación</p>

Anexo W. DISEÑO DE COMPONENTES PRINCIPALES

Esta prueba estadística se la utiliza para lograr una síntesis de información, cuando existen numerosas variables se la utiliza con el fin de reducir la información lo mejor posible. Una vez que la información se encuentra reducida los nuevos factores estarán constituidos por los originales siendo una combinación de estos. Esta prueba se caracteriza porque se reduce una vez observado la relación que hay entre los factores en un inicio. (Durán, J.2010, p12)

Anexo X. PRUEBA DE CHI-CUADRADO

Esta prueba hace una comparación de la distribución que se observa en los datos estudiados con la distribución esperada. Si las dos características llegan a ser independientes, la frecuencia deberá ser igual al producto de frecuencias. Por el contrario, si son dependientes se encontrará diferencias en las frecuencias absolutas respecto a los valores que se obtienen. Todo esto se encuentra en base a los datos de la muestra. (Barreno, I.2012, p22)