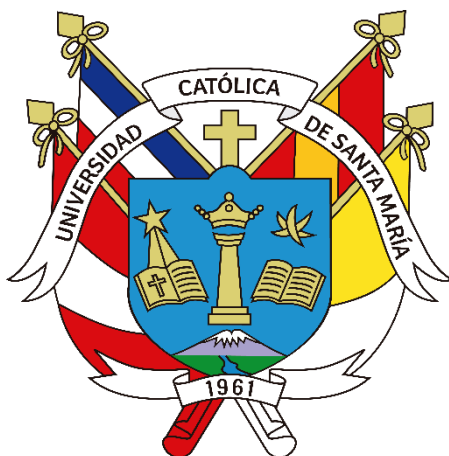


Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



“HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL EFLUENTE AGUA DE BOMBEO CON CEPAS BACTERIANAS PROTEOLÍTICAS Y LIPOLÍTICAS PARA REDUCIR LA CONTAMINACIÓN ORGÁNICA.”

Tesis presentada por la Bachiller:

Meza Neira, Julissa Vanessa

Para optar por el título Profesional
de:

Ingeniero Biotecnólogo.

Asesora:

**Mgter. Paredes Zavala,
Joshelyn.**

Co Asesora:

PhD. Sirvas Cornejo, Susana.

Arequipa – Perú

2022

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 05 de Mayo del 2022

Dictamen: 004610-C-EPIB-2022

Visto el borrador del expediente 004610, presentado por:

2012245212 - MEZA NEIRA JULISSA VANESSA

Titulado:

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL EFLUENTE AGUA DE BOMBEO, CON PROTEASAS Y LIPASAS DE
CEPAS BACTERIANAS PARA LA REDUCCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**0226 - ZARAVIA SANCHEZ CIFRIDO
DICTAMINADOR**



**0737 - PAZ ALIAGA CARLOS EITEL IVAN
DICTAMINADOR**



**2781 - BARREDA DEL CARPIO JAIME ERNESTO
DICTAMINADOR**



DEDICATORIA

A Dios, por su inmenso amor, por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles de mi vida y por haberme dado la oportunidad de cumplir cada uno de mis sueños.

A mis padres Antonio y Gregoria Meza por su incondicional apoyo.

A mi familia por cada palabra de aliento y buenos consejos.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por ser mi guía y colocar en mi vida las personas correctas que me ayudaron a cumplir esta etapa de mi vida.

A mis padres, a mi papito Antonio por haberme impulsado a ser mejor cada día y haber sido un ejemplo de vida y a mi mamita Goyita por ser una mujer fuerte en los momentos difíciles y por su gran apoyo incondicional.

A mis hermanos Marco y Edith por sus consejos, cariño y por siempre alentarme a seguir adelante; y a mis sobrinas Bryanna y Antonela por ser mi alegría.

A mi asesora, Mgter. Joshelyn Paredes Zavala por su apoyo en la aportación de ideas que motivaron el trabajo de investigación.

A mi Co-asesora PhD. Susana Sirvas Cornejo, por sus consejos, enseñanzas, constante apoyo y por ser mi guía durante la realización de este trabajo.

Al Mgter. Eduardo Perochena Escalante, por su tiempo, confianza, sugerencias y orientación.

A la Universidad Católica de Santa María, en particular al Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica por la formación profesional que me brindó con los que estaré siempre agradecida.

Al Instituto Tecnológico de la Producción, al Laboratorio de Biotecnología y a sus investigadores, por la oportunidad y disposición de sus instalaciones donde se llevó a cabo el desarrollo de este trabajo.

A FONDECYT por el financiamiento de la presente tesis, que fue parte del proyecto “Obtención de enzimas recombinantes tipo proteasa y lipasa de cepas bacterianas nativas, mediante clonación y expresión de genes, para biorremediación y aprovechamiento de residuos pesqueros” con el Convenio N° 161-2017-FONDECYT.

Eternamente agradecida

Julissa Vanessa Meza Neira

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue reducir la contaminación orgánica del efluente agua de bombeo, mediante la evaluación y aplicación de bacterias con capacidad proteolítica y lipolítica, además de sus respectivas condiciones de operación en bioprocesos. Fueron aisladas un conjunto de colonias de bacterias en medios de cultivo: TSA, Agar Tributitina, Agar Leche y Agar gelatina, a partir de una muestra de efluente agua de bombeo no tratada. La cepa proteolítica BG18-03 y la cepa lipolítica BL18-06, fueron seleccionadas. Adicionalmente, dos variables independientes (tiempo y temperatura) de bioproceso de hidrólisis, fueron seleccionadas para desproteinizar y deslipidificar el efluente agua de bombeo.

El bioproceso de hidrólisis fue realizado mediante un diseño factorial 2^2 , donde se consideró los efectos individuales y de interacción de las variables independientes temperatura (20 y 35°C) y tiempo (8 y 24 horas). En cada bioproceso se determinó como variables respuesta el porcentaje de desproteinización (%DP), porcentaje de deslipidificación (%DL), y el porcentaje de reducción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5). Las mejores condiciones de operación fueron a 35°C durante 24 horas; donde la cepa proteolítica BG18-03 logró reducir el contenido de proteína del sustrato M1 de 29.5 a 2.4%, con un porcentaje de desproteinización de 93% y una reducción de carga orgánica por DBO_5 de 8945 mg/L a 2276.25 mg/L a 20°C durante 24 horas, es decir la DBO_5 fue reducida en 74.55%. Por otro lado, la cepa lipolítica BL18-06 logró reducir el contenido de grasas del sustrato M7 de 24 a 1.7%, con un porcentaje de deslipidificación de 93% y una reducción de carga orgánica por DBO_5 de 8257.5 mg/L a 3448.8 mg/L a 35°C durante 24 horas, es decir la DBO_5 fue reducida en 58.2%.

Palabras clave: Efluente agua de bombeo, hidrólisis enzimática microbiana, desproteinización, deslipidificación, DBO_5 .

ABSTRACT

The objective of this research was to reduce organic contamination of the pumping water effluent, by evaluating and applying bacteria with proteolytic and lipolytic capacities, in addition to the evaluation of their respective operating bioprocesses conditions. A set of bacterial colonies were isolated in culture media: TSA, Tributitin Agar, Milk Agar and Gelatin Agar from an effluent sample of untreated pumping water. Proteolytic strain BG18-03 and lipolytic strain BL18-06 were selected. Additionally, two independent variables (time and temperature) of the hydrolysis bioprocess were selected to deproteinize and delipidify the pumping water effluent.

The hydrolysis bioprocess was carried out using a 2^2 factorial design, where the individual and interaction effects of the independent variables temperature (20 and 35 ° C) and time (8 and 24 hours) were considered. Deproteinization percentage (% DP), delipidification percentage (% DL), and the BOD₅ reduction percentage, were determined for each bioprocess. The best operating conditions were observed at 35 ° C after 24 hours; where proteolytic strain BG18-03 managed to reduce the protein content of the effluent M1 from 29.5 to 2.4%, with a deproteinization percentage of 93% and a reduction in organic load by BOD₅ from 8945 mg/L to 2276.25 mg/L at 20 ° C after 24 hours, with 74.55% BOD₅ reduction. On the other hand, lipolytic strain BL18-06 managed to reduce the fat content of the M7 substrate from 24 to 1.7%, with a delipidification percentage of 93% and a reduction in organic load by BOD₅ from 8257.5 mg/L to 3448.8 mg/L at 35°C after 24 hours, with 58.2% BOD₅ reduction.

Keywords: Effluent pumping water, microbial enzymatic hydrolysis, deproteinization, delipidification, BOD₅.

ÍNDICE

DEDICATORIA	xiii
AGRADECIMIENTOS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
ABREVIATURAS	xx
INTRODUCCIÓN	xxii
CAPÍTULO I:	1
1. GENERALIDADES	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Objetivos	2
1.2.1. Objetivo general	2
1.2.2. Objetivos específicos	2
1.3. HIPÓTESIS	2
1.4. VARIABLES E INDICADORES	2
1.5. Alcance y tipo de investigación	3
CAPÍTULO II:	4
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. LA INDUSTRIA PESQUERA EN EL PERÚ	4
2.2. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE HARINA Y ACEITE DE PESCADO PARA EL CONSUMO HUMANO INDIRECTO (CHI)	4
2.2.1. Abastecimiento de materia prima	5
2.2.2. Operación en embarcaciones y muelle	5
2.2.3. Etapas de producción dentro de la planta	5
2.3. TIPOS DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA PESQUERA DE LA PRODUCCIÓN DE LA HARINA DE PESCADO	7
2.3.1. Agua de bombeo	7
2.3.2. Sanguanza	7
2.3.3. Agua de cola	8
2.4. IMPACTOS AMBIENTALES OCASIONADOS POR EL VERTIMIENTO DE AGUA DE BOMBEO DURANTE LA PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS DE CONSUMO HUMANO INDIRECTO (CHI)	8
2.5. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LOS EFLUENTES	11
2.5.1. Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	11
2.5.3. Sólidos suspendidos totales (SST)	12

2.5.4. Potencial de Hidrógeno (pH)	12
2.6. MARCO LEGAL AMBIENTAL PARA LAS DESCARGAS DE EFLUENTES PESQUEROS.....	12
2.7. TRATAMIENTO DE EFLUENTES DE PROCESO DE LAS PLANTAS DE HARINA Y ACEITE DE PESCADO	15
2.8. MICROORGANISMOS MARINOS.....	18
2.9. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	19
2.10. DISEÑO EXPERIMENTAL (diseño factorial)	21
2.11.1. Diseño factorial 2 ²	21
2.11.2. Prueba de Tukey Kramer	25
CAPÍTULO III:.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	26
3.2. MATERIALES	26
3.2.1. Material biológico:	26
3.2.2. Material de vidrio:.....	26
3.2.3. Insumos y reactivos:	26
3.2.4. Instrumentos y Equipos:.....	28
3.2.5. Otros:.....	28
3.3. MÉTODOS	29
3.3.1. Aislamiento de bacterias con capacidad proteolítica y lipolítica del efluente agua de bombeo	29
3.3.2. Caracterización de bacterias con mejor capacidad de hidrólisis para proteasas y lipasas	30
3.3.3. Bioensayos de hidrólisis enzimática	32
3.3.4. Caracterización de las muestras obtenidos de los bioprocesos.....	36
3.3.5. Diseño experimental y Análisis Estadístico	39
CAPÍTULO IV	42
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1. Aislamiento, purificación e identificación de cepas bacterianas marinas del efluente agua de bombeo	42
4.1.1. Caracterización de la muestra (sustrato M1 y M7).....	42
4.1.2. Aislamiento, purificación e identificación de cepas bacterianas marinas del efluente agua de bombeo	46
4.2. Caracterización microbiana y pruebas de actividad enzimática en placa	46
4.2.1. Pruebas de capacidad enzimática en placa	46
4.2.2. Pruebas de caracterización microbiana	50

4.2.2.1. Caracterización e identificación cepas bacterianas mediante pruebas de catalasa y oxidasa, tinción Gram y pruebas bioquímicas.....	50
4.3. Bioensayos de hidrólisis enzimática (Biorreacción)	57
4.4. Caracterización de los productos hidrolizados	59
4.5. Análisis estadístico de los bioprocesos de hidrólisis empleando las cepas BG18-03 y BL18-06	62
4.5.1. Análisis del proceso de hidrólisis empleando la cepa BG18-03	62
4.5.2. Análisis del proceso de hidrólisis empleando la cepa BL18-06	70
4.5.3. Análisis comparativo de Tukey Kramer para las mejores condiciones de operación con las cepas BG18-03 y BL18-06.	80
4.5.4. Discusión de los resultados de los bioprocesos y del efecto de las variables sobre la reducción de la materia orgánica (%DBO ₅ reducido), %DL y %DP.	82
CONCLUSIONES	85
RECOMENDACIONES	87
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS	95
Anexo 1	95
1. Caracterización microbiana	95
Anexo 2	96
Anexo 3	103
Anexo 4	104
Anexo 5	105
Anexo 6	106
Anexo 7	107
Anexo 8	108
Anexo 9	109
Anexo 10	110
Anexo 11	111
Anexo 12	112
Anexo 13	113
Anexo 14	114
Anexo 15	115
Anexo 16	116
Anexo 17	117
Anexo 18	118
Anexo 19	119
Anexo 20	120

ABREVIATURAS

AB: Agua de bombeo

AG: Aceites y grasas

ANOVA: Análisis de varianza

%C: Porcentaje de Ceniza

°C: Grados Celsius

DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxígeno en 5 días

DP: Desproteínización

DL: Deslipidificación

%DP: Porcentaje de desproteínización

%DL: Porcentaje de deslipidificación

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

%G: Porcentaje de grasa cruda

%GH: Porcentaje de Grado de Hidrolisis

GL: Grados de libertad

%H: Porcentaje de humedad

IC: Intervalo de confianza

ITP: Instituto Tecnológico de la Producción

LMT: Límites máximos permisibles

MC: Media de cuadrados

%P: Porcentaje de proteína

pH: Acidez o alcalinidad

R²: Coeficiente de determinación

Rpm: Revoluciones por minuto

SC: Sumas de los cuadrados

SST: Sólidos suspendidos totales

TSA: Medio de cultivo Agar Tripticasa de soya

TSB: Medio de cultivo Caldo Tripticasa de soya

UFC: Unidades formadoras de colonias

Valor-p: Valor de probabilidad

vvm: Volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto



INTRODUCCIÓN

Actualmente en el Perú, la industria pesquera es el tercer principal sector económico que genera mayores ingresos de divisas en el país. Este alcanzó exportaciones equivalentes a 1857 y 1643 miles de TMB en el 2019 y 2018 respectivamente, generando divisas por US\$ 3306.4 y 3526 millones en el 2018 y 2019 (1)(2).

Los principales productos pesqueros exportados son los de consumo humano indirecto (CHI) harina y aceite de pescado, siendo sus principales compradores los países asiáticos. Los productos CHI representaron el 43.37% del valor total de las exportaciones del sector en el año 2019 manteniéndose por encima del promedio de los últimos años (1)(2).

Sin embargo, durante años las consideraciones con el medio ambiente marino han sido muy limitadas especialmente en los lugares donde se concentran plantas procesadoras de harina de pescado a lo largo de la costa peruana, generándose contaminación que es producto del vertimiento de efluentes pesqueros al cuerpo marino receptor (3) con niveles que superan los límites máximos permisibles (LMP); ello reduce la calidad del agua haciéndola menos útil y peligrosa para la biodiversidad; y afectando el aprovechamiento de sus recursos por parte del sector pesquero (4).

Durante la extracción de materia prima (anchoveta) para la producción de harina de pescado, el agua de bombeo (AB) es el efluente generado con mayor volumen, debido a que se utiliza en relación 1/1 de agua de mar con respecto a la materia prima para transportar los peces desde la embarcación denominada “Boliche” hacia la planta (5).

El AB está principalmente constituida por materia orgánica suspendida, aceites y grasas, escamas, sangre, viseras y otros (6); que al ser vertidos sin previo o incompleto tratamiento al cuerpo receptor causan grandes problemas ambientales. Estos efluentes, forman finas películas que obstruyen el paso del oxígeno del aire; deteriorando el proceso de fotosíntesis ya que estos componentes orgánicos al degradarse por acción de la temperatura, atrapan moléculas de oxígeno ocasionando asfixia de las especies que se encuentren presentes en el lugar afectado (3).

Debido a esto el Estado Peruano crea instrumentos de gestión ambiental que velan por la protección y preservación del medio ambiente, exigiendo que se adopten medidas para reducir, prevenir y controlar los daños de contaminación en el entorno marítimo; entre ellos está el

Decreto supremo N° 010-2008-PRODUCE “Límite Máximos Permisibles (LMP) para la Industria de Harina y Aceite de Pescado y Normas Complementarias” que permite la medida de parámetros físicos, químicos y biológicos que logren caracterizar un efluente o emisión; que al ser vertido pueda causar daños al ambiente, salud y bienestar humano. Entre los parámetros reguladores fijados están: Aceite y Grasas (AG), Sólidos Suspendidos Totales (SST), Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) y acides o alcalinidad (pH) (7).

Los establecimientos industriales pesqueros deben monitorear la calidad de sus efluentes conforme al programa de monitoreo ambiental y elaborar informes de acuerdo al Protocolo de Monitoreo de Efluentes de los Establecimientos Industriales Pesqueros de Consumo Humano Directo e Indirecto (8).

Los tratamientos de efluentes pesqueros son un proceso costoso y deficiente, que no logran reducir los valores tal como lo estipulan los LMP. Entre los tratamientos utilizados actualmente están los físicos y químicos que después de tratar el efluente aun presentan niveles muy altos de materia orgánica y grasas (9). Además, durante los tratamientos químicos los sólidos y líquidos separados no quedan exentos de contaminantes químicos dañinos para el medio ambiente (10).

Es por ello que el presente trabajo de investigación propuso utilizar técnicas biotecnológicas que contribuyan al tratamiento biológico como alternativa a los procesos tradicionales, ya que se utiliza la versatilidad metabólica de los microorganismos para la hidrólisis enzimática de lípidos y proteínas presentes en el efluente agua de bombeo y al ser completamente inofensivos con el medio ambiente permiten reducir la contaminación orgánica sin dejar trazas de contaminantes.

CAPÍTULO I:

1. GENERALIDADES

1.1. Formulación del problema

Una de las principales actividades productivas del Perú en el sector pesquero es la producción de harina y aceite de pescado, lo cual genera grandes ganancias para el país generando numerosos puestos de trabajo. Sin embargo, también genera efluentes que en muchos casos no son adecuadamente tratados, antes de ser vertidos. El efluente con mayor volumen es conocido como agua de bombeo (AB) que está conformado por sangre, trozos de pescado y otros desechos orgánicos generados durante el transporte o bombeo del pescado desde las embarcaciones hasta la planta de producción de harina.

Cuando el AB es vertida al cuerpo receptor, en muchos casos sobrepasa los LMP de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) que es un indicador estándar para medir el contenido de materia orgánica que según el Decreto Supremo N° 010-2008-PRODUCE es de 60 mg/L fuera de la Zona de Protección Ambiental Litoral (7). A pesar de ello, muchas empresas pesqueras no cumplen, a pesar de que cuentan con tratamientos físicos y químicos, siendo el más utilizado el sistema de Flotación por Aire Disuelto (DAF) que se utiliza para separar sólidos, grasas y aceites de los efluentes industriales; está basado en la coagulación y flotación mediante la adición de productos químicos, tales como poliacrilamida, cloruro férrico ($FeCl_3$) o sulfato de aluminio ($Al_2(SO_4)_3$), teniendo como objetivo reducir la DBO_5 y clarificar el líquido tratado (11).

Por lo tanto, es necesario aplicar nuevas tecnologías que sean eco amigables, utilizando herramientas biotecnológicas que reemplacen los tratamientos químicos y físicos aplicados actualmente durante el tratamiento de efluentes pesqueros.

En el presente trabajo de investigación se plantea los siguientes problemas:

¿Es posible encontrar microorganismos bacterianos que permitan hidrolizar el efluente agua de bombeo?

¿Será posible evaluar microorganismos y condiciones de operación de hidrólisis enzimática, para reducir el contenido de proteínas y lípidos en el efluente agua de bombeo?

¿Será posible hidrolizar el efluente agua de bombeo con los microorganismos aislados a diferentes condiciones de bioproceso?

¿Será posible encontrar las mejores condiciones de operación para reducir de manera eficiente el contenido de proteínas y lípidos con cada microorganismo bacteriano?

¿Será factible encontrar el mejor microorganismo bacteriano que logre hidrolizar el efluente agua de bombeo para reducir el contenido orgánico?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Reducir la contaminación orgánica en el efluente agua de bombeo mediante bioprocesos de hidrólisis enzimática usando bacterias proteolíticas y lipolíticas.

1.2.2. Objetivos específicos

- Seleccionar bacterias con actividad enzimática de tipo proteolítica y lipolítica.
- Caracterizar bacterias de agua de bombeo seleccionadas por tener mayor capacidad de hidrólisis para proteínas y lípidos.
- Realizar bioensayos de hidrólisis enzimática (bioprocesos).
- Caracterizar los productos obtenidos de los bioprocesos.
- Comparar estadísticamente la eficiencia de los bioprocesos en la reducción de la contaminación orgánica.

1.3. HIPÓTESIS

Bioprocesos de hidrólisis enzimática con bacterias proteolíticas y lipolíticas permitirán reducir la contaminación orgánica en el efluente pesquero agua de bombeo.

1.4. VARIABLES E INDICADORES

Tabla 1. Variables independientes, dependientes e indicadores del presente trabajo de investigación.

Variables Independientes	Indicadores
Tiempo	- Horas
Temperatura	- °C
Variables dependientes	Indicadores
Nivel de contaminación orgánica del efluente medido mediante:	- DBO ₅ (mg/L de O ₂)
- Demanda bioquímica de oxígeno	- %DP
- Contenido de proteínas	- %DL
- Contenido de lípidos	

Fuente: elaboración propia (2022).

1.5. Alcance y tipo de investigación

El trabajo de investigación presentado es de tipo experimental y tiene un nivel de tipo descriptivo y correlacional.

1.6. Delimitación espacial y temporal

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y del Laboratorio de Fisicoquímica del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), Callao-Perú. La parte experimental se llevó a cabo durante el periodo de mayo del 2018 hasta noviembre del 2019.

CAPÍTULO II:

2. MARCO TEÓRICO

2.1. LA INDUSTRIA PESQUERA EN EL PERÚ

La industria pesquera en el Perú durante el siglo XX sigue siendo una de las que genera los principales ingresos de divisas al país, sin embargo, cada año ha reducido su producción de productos de consumo humano indirecto (harina y aceite de pescado) y consumo humano directo (congelados y conservas) debido a que la biomasa varía según las condiciones ambientales, cambios climáticos, meteorológicos, oceanográficos (fenómenos El Niño y La Niña) (12) que han afectado negativamente al mar peruano, siendo sardina la especie extraída mayormente hace unos años y actualmente reemplazada por anchoveta (*Engraulis ringens*) por su alto contenido proteico y lipídico (13)(14). Las empresas pesqueras generan grandes cantidades de efluentes residuales durante la extracción de materia prima, producción, limpieza y uso doméstico. En muchos casos, sus sistemas de tratamiento de efluentes pesqueros no son adecuados y eliminan estos residuos al cuerpo marino receptor incumpliendo los límites máximos permisibles (3).

Esta industria podría causar un daño irreversible al mar por la acumulación de grasas, aceites, sólidos suspendidos, en general de materia orgánica conllevando a irrumpir la cadena alimenticia impidiendo que las algas realicen una correcta fotosíntesis por la falta de oxígeno y luz que son opacados por biopelículas formadas en la parte superior del mar y por ende a la disminución de especies marinas por falta de alimento y muerte por asfixia (6).

2.2. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE HARINA Y ACEITE DE PESCADO PARA EL CONSUMO HUMANO INDIRECTO (CHI)

El proceso productivo de harina y aceite de pescado que será detallado en este trabajo fue descrito en la guía de elaboración de estudios de impacto ambiental para la actividad de consumo humano indirecto (CHI) harina y aceite de pescado (PRODUCE 2008) (15) y Espinosa (2014) (16).

Se describirán las principales etapas:

2.2.1. Abastecimiento de materia prima

En esta etapa la materia prima es extraída del mar. Se utiliza métodos de preservación como la temperatura baja para mantener la calidad de la materia prima.

2.2.2. Operación en embarcaciones y muelle

Una vez obtenida la materia prima, se procede a transportarla desde las bodegas de las embarcaciones, hasta contenedores mediante sistemas absorbentes de bombeo utilizando grandes cantidades de agua de mar que bombean el pescado hasta la planta.

2.2.3. Etapas de producción dentro de la planta

a. Desagüe de materia prima

La mezcla de agua-pescado es almacenada en la planta por los desagüadores rotativos o vibratorios, para lograr separar la mayor cantidad de agua de mar (agua de bombeo), pasando hacia un transportador de mallas, el cual facilita el escurrimiento de la materia prima, para ser llevada hasta la tolva de pesaje. El AB luego de ser tratada o no, es devuelta al mar.

b. Cocinado

Una vez pesado el pescado es almacenado en pozas de almacenamiento desde donde se extrae por medio de transportadores helicoidales que alimentarán un elevador que abastecerá un tolvin de forma continua hacia un cocinador.

c. Pre-prensado

El pescado cocido pasa a la etapa de pre-prensado que tiene por finalidad separar dos fracciones una sólida y otra líquida para simplificar la siguiente operación.

d. Prensado

En la etapa de prensado se obtienen dos fases, una sólida llamada torta de prensa con mínima cantidad de grasa y agua. Otra fase líquida obtenida es denominada licor o caldo de prensa que contiene agua, grasa, sólidos insolubles y solubles.

e. Separación, Centrifugado y Evaporación de Agua de Cola

La fase llamada licor de prensa que contiene un alto porcentaje de sólidos insolubles, solubles y aceites son tratados mediante separadores de sólidos tales como centrifugas y plantas evaporadoras de agua de cola, obteniendo: licor, torta, cola, aceite y concentrados.

f. Secado

En esta etapa se mezcla la torta de prensa con la torta separadora y concentrada para obtener un mix de torta, la cual pasa previamente por un molino “húmedo” para facilitar el desmenuzamiento de la misma, luego ingresa a la etapa de secado. Durante el secado se elimina el exceso de agua, siendo este el proceso térmico más severo al que es sometido el producto; esta operación unitaria es determinante para la calidad de harina y para el consumo de energía por la planta.

Esta harina resultante contiene humedad de hasta 10%, por lo cual es llevada a un molino “seco” permitiendo obtener una granulometría adecuada exigida por los parámetros de calidad.

g. Enfriamiento y Molienda

La harina obtenida es enfriada a temperaturas bajas de 40°C permitiendo una mayor conservación de las cualidades nutricionales evitando problemas que se podrían producir como consecuencia de la temperatura; este enfriamiento se realiza utilizando grandes volúmenes de aire.

Durante esta etapa la harina es un producto inestable, debido fundamentalmente a su contenido de grasas por lo que se procede a la adición antioxidantes de origen químico.

h. Ensaque y Almacenamiento

Por último, la harina es envasada, ensacada y almacenada para su posterior comercialización. Mientras que el aceite crudo producto de la etapa de centrifugación, es almacenado en tanques para posteriormente ser comercializado.

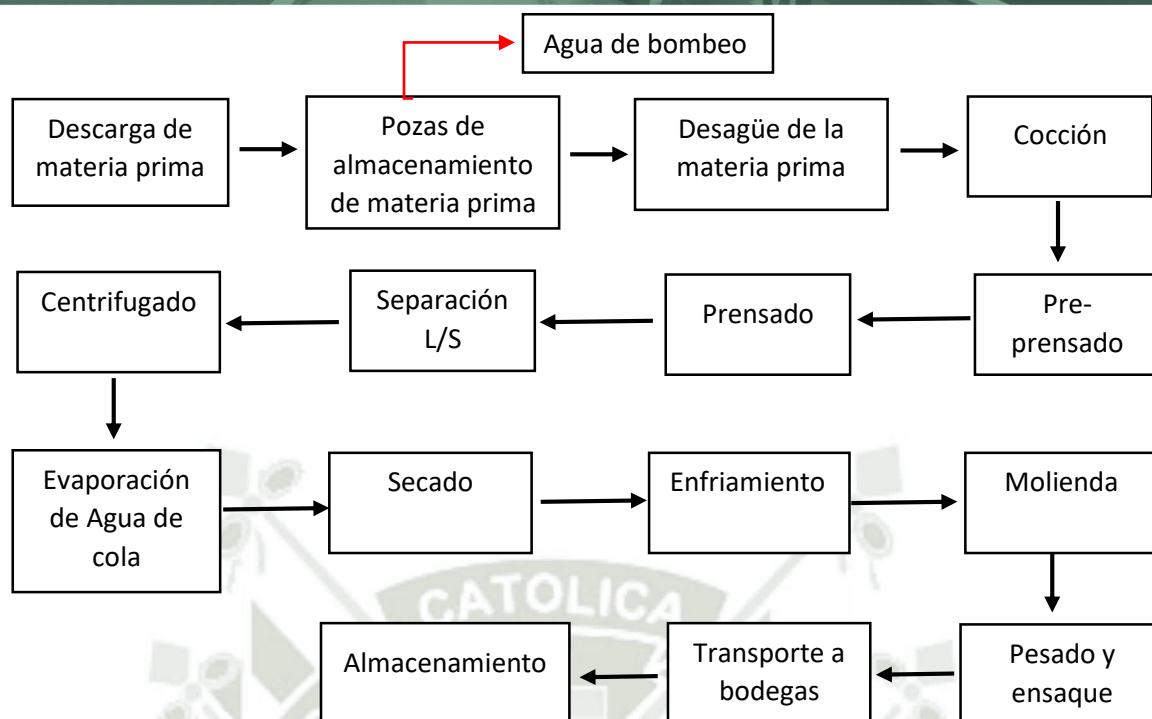


Figura N° 1. Diagrama de procesos para la elaboración de harina de pescado. Fuente: elaboración propia (2022).

2.3. TIPOS DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA PESQUERA DE LA PRODUCCIÓN DE LA HARINA DE PESCADO

La industria pesquera genera diversos efluentes que contienen aceites, grasas, proteínas, es decir materia orgánica contaminante, medida en función a la DBO₅; entre ellos tenemos:

2.3.1. Agua de bombeo

Este efluente es el de mayor volumen generado durante el transporte del pescado que se bombea con agua de mar por tuberías desde las bodegas de las embarcaciones denominadas “las chatas” hasta las pozas de almacenamiento de las plantas. Durante este proceso, la materia prima se deteriora debido al tiempo de almacenamiento a una temperatura inadecuada, generando materia orgánica contaminante, como proteínas, aceites y grasas en suspensión y en solución (11)(16).

2.3.2. Sanguanza

Es el efluente que contiene agua, sangre, escamas, sólidos y grasas que se forman por la degradación enzimática propia de los peces, en las bodegas de las embarcaciones y en las pozas de almacenamiento de materia prima de las plantas, antes de su transformación (11)(16).

2.3.3. Agua de cola

Durante el proceso de obtención de harina y aceite de pescado se genera este efluente como una fracción líquida después de la operación de prensado, que posteriormente se centrifuga recuperando gran parte del aceite. El agua de cola no se vierte al cuerpo marino, sino que se retorna al proceso (16).

2.4. IMPACTOS AMBIENTALES OCASIONADOS POR EL VERTIMIENTO DE AGUA DE BOMBEO DURANTE LA PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS DE CONSUMO HUMANO INDIRECTO (CHI)

Como afirmaba Carranza (1999), uno de los más grandes impactos negativos hacia el medio ambiente por parte de las industrias procesadoras de harina y aceite de pescado recae en la extracción de la materia prima la cual utiliza grandes volúmenes de agua de mar para el traslado de la materia prima a través de sistemas de bombeo desde embarcaciones con deficiencias en el sistema de enfriamiento de sus bodegas; hasta los contenedores que son llevados a la planta de procesamiento. Estos efluentes residuales denominados agua de bombeo contienen escamas, grasas, sangre, residuos orgánicos en suspensión que luego es expulsada al cuerpo marino receptor sin ningún tratamiento. Posteriormente esto se convierte en floculantes negruzcos y películas de sólidos en suspensión con fuertes olores sulfurosos que impiden la rápida oxigenación del fondo provocando la muerte de los organismos vivos presentes en la zona y causando el deterioro de la calidad del agua (17).

Según García et al. (2009); la instalación de plantas industriales, ha ocasionado la contaminación de bahías, debido a la descarga y desechos (agua de cola y agua de bombeo) sobre las aguas marinas. Debido a la acumulación de contaminantes en el mar causan el desequilibrio en sus propiedades físicas, químicas y biológicas; siendo estas afectadas por cambios en la salinidad, disminución de oxígeno disuelto, incremento de nutrientes, incremento de la DBO₅, alta carga de sulfuros y amonio en sedimentos y por ello el incremento de la temperatura; conllevando a un proceso de eutrofización, ocasionando la falta de oxígeno en el fondo del mar y posterior muerte de la fauna. Además, los organismos inmediatamente afectados por estas aguas de desecho son de lento o nulo movimiento como los moluscos (almejas, ostiones y callo de hacha) (18).

Según lo descrito por Marín et al. (2015), los problemas ambientales se deben a que la mayoría de plantas que no cuentan con sistemas propios de tratamientos de aguas residuales

y optan por evacuarlas al sistema de alcantarillado doméstico, quebradas, ríos y al mar sin atender la normativa ambiental vigente. Ello justifica el desarrollo de tecnologías de tratamiento para un adecuado manejo de efluentes pesqueros. En este sentido, utilizando alternativas viables como son los tratamientos biológicos debido a la versatilidad metabólica de los microorganismos para oxidar la materia orgánica y por subsecuente la reducción del contenido de otros contaminantes (19).

Según Gonzáles et al. (2010) en el año 2008 la actividad industrial en el puerto de Mar del Plata, ocasionó grandes inconvenientes debido a los efluentes pesqueros de consumo humano indirecto que generó el deterioro de las playas a nivel sanitario; afectando negativamente al sector turístico (20).

Como afirma Espinoza (2016) el agua de bombeo es el efluente residual con mayor volumen generado durante el procesamiento de productos de consumo humano indirecto; en el 2015 se utilizó un aproximado de 7.22 millones de m³ de agua de mar retornados como agua de bombeo al cuerpo marino receptor. Por consiguiente, si no se da un debido tratamiento a este efluente a este paso habría grandes pérdidas económicas de 300 millones de dólares para las empresas que son las responsables de la contaminación del ambiente marino (21).

Antecedentes

Guzmán, W. y Pastor J. (2020) en Nuevo Chimbote- Ancash investigaron el *Efecto de microorganismos eficaces en el tratamiento de sanguanza proveniente de la empresa pesquera Panafoods S.A.C.* Utilizaron microorganismos eficaces (ME) a condiciones aerobias para evaluar la degradación de la carga orgánica del efluente de Sanguanza de una empresa pesquera de la zona. Lograron obtener una eficiente remoción del 82% para aceites y grasas y una ineficiente reducción de 28.95% para nitrógeno total (22).

Sifuentes, G., León, S., Castillo, A. (2018) En Chimbote- Ancash estudiaron la *hidrólisis de proteínas de anchoveta (Engraulis ringens) por acción de la enzima comercial Protamex™*. Evaluaron el efecto de los factores de reacciones catalíticas como la relación enzima sustrato (E/S), factor de dilución y tiempo de reacción con respecto al grado de hidrólisis de proteínas de anchoveta entera por acción de la enzima comercial Protamex™. Concluyeron que esta enzima es eficiente para la extracción de proteínas de la anchoveta (13).

Marín, J., Chinga C., Velásquez A., Gonzáles P., Zambrano, L. (2015) En Ecuador realizaron una investigación sobre el *Tratamiento de aguas residuales de la industria procesadora de pescado utilizando reactores anaeróbicos discontinuos*. Se evaluó el tratamiento de aguas residuales de la industria pesquera, en reactores anaeróbicos discontinuos utilizando como inóculo lodos procedentes de efluentes industriales obteniendo como resultado una baja eficiencia, Es por ello que la literatura recomienda realizar ensayos de biodegradabilidad con microorganismos aerobios, para comparar la eficiencia de ambos tratamientos (19).

Arias, D., Méndez, E. (2014) En la ciudad de Mazatlán, Sinaloa, México se realizó el proyecto *Remoción de sólidos en aguas residuales de la industria harinera de pescado empleando biopolímeros*. El objetivo de esta investigación fue remover la mayor cantidad de materia orgánica en la fase de pretratamiento de las aguas residuales de las empresas pesqueras; para ello utilizaron polímeros orgánicos naturales para la coagulación tales como el quitosán, alginato de sodio y ácido tánico. Logrando reducir hasta un 97.78% de sólidos suspendidos totales con una mezcla de 200 mg l⁻¹ de quitosán con 20 mg l⁻¹ de ácido tánico (23).

Alexandre, V., Valente, A., Cammarota, M., Freire, D. (2011) Uno de los pioneros realizando proyectos como *Performance of anaerobic bioreactor treating fish-processing plant wastewater pre-hydrolysed with a solid enzyme pool*, fue Brasil que aplicó técnicas de bioremediación a los efluentes de la industria pesquera; utilizando una mezcla rica en lipasas producidas por el hongo *Penicillium simplicissimum* para hidrolizar un efluente residual generado por las empresas pesqueras. Estas fueron inoculadas en un biorreactor de manta de lodo de flujo ascendente (UASB) a ciertas condiciones de operación; logrando buenos resultados debido a su alta eficiencia de reducción de DQO, DBO₅ y contenido de grasas y aceites (24).

Zamora, J., Paniagua, J., Lezama, C. (2007) El trabajo de investigación *A Novel Approach for Bioremediation of a Coastal Marine Wastewater Effluent Based on Artificial Microbial Mats*; realizado en México desarrolló una alternativa novedosa para la biorremediación de efluentes residuales de la industria pesquera; utilizando esteras microbiológicas una tecnología biotecnológica que mostró altas eficiencias de remoción de nitrógeno y fósforo durante 48 horas. Estas esteras estuvieron compuestas por géneros de cianobacterias como *Chroococcus sp.*, *Lyngbya sp.* Y la bacteria *Nitzschia sp.* Concluyéndose que las esteras

microbianas son una alternativa innovadora, económica y ambientalmente segura para el tratamiento de aguas residuales en ambientes marinos costeros (25).

2.5. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LOS EFLUENTES

Los parámetros de calidad de los efluentes pesqueros usados en este trabajo son:

2.5.1. Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅)

Llamada también demanda bioquímica de oxígeno al quinto día, esta consiste en la medición de la cantidad de oxígeno (mg/L) disuelto que tiene la materia orgánica presente en una muestra de efluente residual (16). Este parámetro DBO₅ es un indicador de la cantidad de materia orgánica biodegradable y de la presencia de microorganismos en una muestra de agua, por consiguiente, un valor alto de este parámetro indica que hay una elevada cantidad de materia orgánica, llegando a necesitar mayor cantidad de oxígeno para lograr su oxidación y descomposición total, siendo esto desfavorable para las especies marinas ante una posible reducción de oxígeno disuelto disponible (26). Según Madigan et. al. (2004) en los ecosistemas acuáticos, los microorganismos fototrópicos son generalmente los que consumen la mayor parte de la materia orgánica generando el agotamiento del oxígeno en el medio (27).

Esta prueba, se realiza mediante procedimientos estandarizados en laboratorios certificados por el estado, para lograr describir aquellos requisitos relativos de oxígeno en diferentes tipos de efluentes residuales. La DBO₅ está considerada en el marco legal como un indicador de contaminación orgánica en efluentes pesqueros (30).

2.5.2. Aceites y grasas (AG)

Los aceites y grasas están compuestos en su mayor parte por triglicéridos, que también son llamados ésteres (28).

La cantidad total de aceites y grasas para una sustancia en particular no es estimada, por ello se tiene que diferenciar agrupaciones de sustancias con atributos físicos comparables que dependerán principalmente de la disolubilidad de estos en el disolvente. Incorporando así la expresión “grasas y aceites” a cualquier material recuperado como sustancia soluble en el disolvente (hexano). Siendo su unidad de medida mg/L (22).

2.5.3. Sólidos suspendidos totales (SST)

Según IDEAM (2007) (29) las aguas de efluentes tienen tres tipos de sólidos no sedimentables que son: suspendidos, coloidales y disueltos. Existen dos tipos de sólidos suspendidos; los más pequeños (menores a 0.01 mm) que no sedimentan rápidamente considerados sólidos no sedimentables, y los más grandes (mayores a 0.01 mm) que son sedimentables. Estos son transportados gracias a la acción de arrastre y soporte del movimiento del agua. Los sólidos coloidales que están conformados por bacterias, virus, partículas causantes de color, etc., estos demoran en sedimentar y su efecto se traduce en la turbiedad y el color de efluentes sin coagulación. También están los sólidos disueltos que son la materia orgánica e inorgánica que no son sedimentables y causan diferentes problemas como el olor, sabor, color y salud; para ello se debe de precipitar y remover mediante métodos físicos y químicos. Para determinar este parámetro se utiliza un método gravimétrico y sus unidades son mg/L.

2.5.4. Potencial de Hidrógeno (pH)

La acidez de los efluentes residuales se debe a la disociación de compuestos orgánicos e inorgánicos que son influenciados por ácidos como el sulfúrico, fosfórico, carbónico, nítrico, etc. Por otro lado, la alcalinidad de los efluentes se genera por la disociación de una solución acuosa produciendo iones hidróxido como, por ejemplo: la soda caustica y el amoníaco. Causando niveles extremos de pH efectos dañinos (emulsionamiento de aceites, precipitación, volatilización de sulfuro y corrosión) (26). El pH según Marín *et al.* (2015) (19) de los efluentes pesqueros es de 6 a 7.

2.6. MARCO LEGAL AMBIENTAL PARA LAS DESCARGAS DE EFLUENTES PESQUEROS

Entre los aspectos legales, bajo los que se rige la obtención de permisos y certificaciones ambientales en la actividad pesquera, se encuentran en la Ley General de Pesca (Decreto Ley N° 25977) y el Reglamento de la Ley General de Pesca (D.S.N° 012-2001-PE). Además, hay que tener en cuenta que existen otras autoridades que exigen la obtención de otros permisos para la autorización de vertimiento de aguas a cargo de la Dirección General de Salud (DIGESA), autorizaciones de DICAPI, INRENA o la licencia para el uso de aguas a cargo del ANA perteneciente al ministerio de agricultura (15).

Según la guía de elaboración de estudios de impacto ambiental para actividad de consumo humano indirecto harina y aceite de pescado PRODUCE (2008) (30) hay una relación de dispositivos legales que están vinculados con la gestión ambiental que son los siguientes:

- Ley General de Pesca (Decreto Ley N° 25977).
- Reglamento de la Ley General de Pesca (Decreto Supremo N° 012-2001-PE) y modificatorias.
- Resolución Ministerial N° 003-2002-PE Protocolo para el Monitoreo de Efluentes y Cuerpo Marino Receptor.
- Reglamento de Inspecciones y Sanciones Pesqueras y Acuícolas (RISPAC) D.S. N° 016-2007-PRODUCE
- R.M. N° 621-2008-PRODUCE, Establece disposiciones para realizar innovación tecnológica para mitigar las emisiones al medio ambiente y su modificatoria.
- D.S. N° 010-2008-PRODUCE, Establecen Límites Máximos Permisibles (LMP) para la industria de harina y Aceite de Pescado y normas complementarias.
- R.M. N° 395-2008-PRODUCE. Disposiciones referentes a solicitudes de traslado o ampliación de capacidad instalada de plantas de harina y aceite de pescado a la zona comprendida al sur de los 16ª LS, así como de otorgamiento de certificado de estudios de impacto ambiental.
- Ley General del Ambiente, Ley N° 28611.
- Ley Marco para el Crecimiento de la Inversión Privada (Decreto Legislativo N° 757 y modificatorias).
- Ley General de Aguas (Decreto Ley 17752, sus Reglamentos y modificatorias)
- Ley Marco del Sistema Nacional de Gestión Ambiental (Ley N° 28245) y su Reglamento D.S. N° 008-2005-PCM.
- Ley de Áreas Naturales Protegidas (Ley N° 26834) y su Reglamento D.S. N° 038- 2001-AG.
- Ley General de Residuos Sólidos (Ley N° 27314) y su Reglamento (D.S: N° 057- 2004-PCM).
- Ley del Sistema Nacional de Evaluación de Impacto Ambiental (Ley N° 27446).
- Ley Orgánica para el Aprovechamiento Sostenible de los Recursos Naturales (Ley N° 26821).
- Delitos contra la ecología, Título 13 del Código Penal.

- D.S. N° 085-2003-PCM. Reglamento de Estándares Nacional de Calidad Ambiental para Ruidos.
- D.S. N° 074-2001-PCM. Reglamento de Estándares Nacionales de Calidad Ambiental del Aire.
- D.S. N° 003-2008-MINAM, Estándares de Calidad Ambiental para Aire.
- D.S. N° 002-2008-MINAM, Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua.
- Norma Técnica Peruana NTP 900.058-2005, Código de Colores para Dispositivo de Almacenamiento de Residuos.
- Resoluciones Directorales 0510-99/DCG y 069-98/DCG.
- Ley general de la pesca N°25977. Art 6. El estado vela por la protección y preservación del medio ambiente, exigiendo que se adopten las medidas necesarias para prevenir, reducir y controlar los daños o riesgos de contaminación o deterioro en el entorno marítimo terrestre y atmosférico.

También están los Límites Máximos Permisibles (LMP) que dictaminan los valores de los parámetros químicos, biológicos y/o físicos que no deben de superarse (Tabla 2), pues esto representaría un peligro para el bienestar humano y la vida en el mar (22). Esta información esta detallada en el diario El Peruano por el Ministerio de Medio Ambiente. (PRODUCE 2008) (7).

Tabla 2. Límites máximos permisibles para los efluentes pesqueros.

PARÁMETROS CONTAMINANTES	I	II	III
	LMP DE LOS EFLUENTES QUE SERAN VERTIDOS DENTRO DE LA ZONA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL LITORAL (a)	LMP DE LOS EFLUENTES QUE SERAN VERTIDOS FUERA DE LA ZONA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL LITORAL (a)	LMP DE LOS EFLUENTES QUE SERAN VERTIDOS FUERA DE LA ZONA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL LITORAL (b)
Aceites y grasas (AG)	20 mg/L	$1,5 \cdot 10^3$ mg/L	$0,35 \cdot 10^3$ mg/L
Solidos suspendidos totales (SST)	100 mg/L	$2,5 \cdot 10^3$ mg/L	$0,70 \cdot 10^3$ mg/L
pH	6-9	5-9	5-9
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	≤ 60 mg/L	(c)	(c)

Dónde: (a) La Zona de Protección Ambiental Litoral establecida en la presente norma es para uso pesquero. (b) De obligatorio cumplimiento a partir de los dos (2) años posteriores a la fecha en que sean exigibles los LMP señalados en la columna anterior. (c) Ver Segunda Disposición Complementaria y Transitoria. (d) El Protocolo de Monitoreo será actualizado.

Fuente: Produce (2008) (7).

2.7. TRATAMIENTO DE EFLUENTES DE PROCESO DE LAS PLANTAS DE HARINA Y ACEITE DE PESCADO

Según la Guía para la actualización del Plan de Manejo Ambiental de los establecimientos industriales pesqueros del PRODUCE (2009) indica que todos los equipos, que componen el proceso de tratamiento de agua de bombeo, deberán de tener las características necesarias en cuanto a tecnología, capacidad y eficiencia, para garantizar el correcto manejo y tratamiento del volumen de agua de bombeo, así como para retener el máximo de materia orgánica posible (6).

Según Espinoza (2014) y Cabral (2020), Las técnicas de tratamiento de efluentes son una serie de procesos físicos, químicos y biológicos, con el objetivo de eliminar y/o reducir los contaminantes de estas, para ser reutilizables en el medio y, a la vez, generar un residuo sólido o fango para otros propósitos potenciales. Estas aguas residuales son producidas por zonas urbanas, instituciones, edificios comerciales y plantas industriales. Dependiendo del tipo de contaminante, efluente y lugar de procedencia, se deben aplicar los distintos tratamientos para evitar daños al medio ambiente (26). Y se dividen en diversos tratamientos:

- a) **Tratamiento previo:** Consiste en separar y/o eliminar cuerpos de gran tamaño, y evitar que ingresen a los tratamientos posteriores. En esta etapa se realiza la pre-aireación eliminando compuestos volátiles aumentando su contenido de oxígeno, lo que disminuye los malos olores que se pueden generar. Entre las operaciones que forman parte de este tratamiento previo, tenemos: Desbaste; la cual consiste en la retención de sólidos grandes (partículas entre 0.3 y 1.5 mm) mediante rejillas y tamices. Desarenado; que se realiza por sedimentación. Separación de grasas y aceites: Generalmente, por flotación, la insuflación del aire, para desmenuzar las grasas, que tienden a subir a la superficie.
- b) **Tratamiento primario:** El tratamiento primario tiene como objetivo la separación y remoción (por medios físicos) de los elementos en suspensión que no se hayan podido separar, retener o eliminar en los tratamientos previos. Asimismo, de las sustancias que contienen grasas y aceites y que pueden estar aún en el efluente. [10] Entre los tratamientos

primarios, tenemos: (i) La sedimentación; donde el agua residual pasa a través de enormes tanques circulares o rectangulares, llamados clarificadores primarios o tanques de sedimentación primarios, los cuales están equipados con raspadores para recoger los fangos producidos y llevarlos a otras etapas de los tratamientos. (ii) La coagulación: Es el proceso de desestabilización de las partículas coloidales contenidas en las aguas residuales, originada por añadir un reactivo químico denominado coagulante. Este reactivo cumple la función de neutralizar las cargas eléctricas de las partículas, provocando que tiendan a unirse entre sí. El proceso se realiza en una unidad de tratamiento llamada mezcla rápida, donde se añade el coagulante. Después, se necesita una agitación lenta, que se desarrolla en un floculador. Es ahí donde las partículas chocan entre sí, se aglomeran y forman otras partículas mayores denominadas flóculos (floculación); entre los coagulantes más utilizados tenemos al sulfato de aluminio, cloruro de aluminio, cloruro férrico y sulfato férrico. (iii) La floculación: es el proceso encargado de reunir partículas coaguladas y desestabilizadas presentes en las aguas residuales, luego de la adición de un coagulante; para luego separarlas bajo la forma de aglomeraciones de mayor peso y tamaño llamados flóculos. Estas al no estar configuradas como masa continua, permite su remoción mediante la sedimentación, flotación o filtración.

- c) **Tratamiento secundario:** tiene la finalidad de degradar la materia orgánica en disolución y en estado coloidal, que no ha podido ser eliminada en tratamientos previo. Este tratamiento se denomina biológico, porque está basado en la capacidad que tienen los microorganismos en degradar la materia orgánica. El tratamiento consiste en un proceso por el cual los microorganismos son capaces de asimilar la materia orgánica y los sólidos en suspensión produciendo: anhídrido carbónico, agua y nueva biomasa bacteriana que se separa y precipita por decantación (decantador secundario); este se lleva a cabo generalmente en reactores o en cubas de aireación.

El resultado de esa limpieza y clarificación del agua residual, es la producción de unos fangos que deben ser removidos. Asimismo, los flóculos bacterianos generados en el reactor, tienden a sedimentarse y reciben el nombre de fango activo. Los tratamientos secundarios más utilizados son:

- **Filtros percoladores:** Es un sistema de lechos compuesto por una cama de grava donde una biopelícula formada por colonias bacterianas adheridas a esta, funcionan como medio filtrante sobre la cual se rocían las aguas residuales pretratadas. Las bacterias eliminan los compuestos contaminantes mediante su metabolismo.

- **Fangos activos:** Es un tratamiento de depuración biológica, que consiste en el desarrollo de un cultivo bacteriano aerobio, agitado, disperso en forma de flóculo y en suspensión que se alimenta del agua residual, siendo capaz de metabolizar los contaminantes biológicos que conforman el efluente industrial.

- **Lagunas de estabilización:** Es un método natural que se basa en la construcción de reservorios artificiales, producto de excavaciones de pocas profundidades que tienen la finalidad de tratar y embalsar las aguas residuales mediante factores biológicos y mejorar sus características sanitarias aprovechando el proceso bio-químico y físico denominado autpurificación natural.

- **Digestión Aerobia:** Es la descomposición de lodos orgánicos en presencia de oxígeno, con producción de CO₂, agua, lodos estabilizados y oxidación. Este proceso se realiza en un estanque abierto que requiere oxígeno, por lo que necesita aireación prolongada. En condiciones aeróbicas, las bacterias consumen la materia orgánica y la transforman en dióxido de carbono. Cuando haya carencia de materia orgánica, las bacterias mueren y sirven como alimento para otras.

- d) **Tratamiento terciario:** El tratamiento terciario elimina la materia orgánica no depurada en el tratamiento biológico. Este tratamiento es la etapa final de cualquier agua residual para aumentar su calidad y pureza, de acuerdo al estándar exigido para ser descargado en el ambiente receptor (río, mar, campo, lago, etc.). A pesar de su gran eficiencia, no todas las plantas tienen este tipo de tratamiento. Es poco aplicado en la depuración de aguas residuales urbanas y es restringido en las aguas industriales urbanas (16).

Según Coronado (2018) el tratamiento del agua de bombeo (Figura 2) inicia con el ingreso a los filtros rotativos con aberturas de malla de diferente diámetro (0.1– 1 mm), con el fin de recuperar sólidos, que reingresan al proceso, posteriormente el efluente ingresa a una trampa de grasa y celdas DAF con inyección de microburbujas, para atrapar las moléculas de grasa que ascenderán a la superficie y que por medio de un barrido se colectarán en un tanque de espumas. El efluente resultante es derivado a un tanque equalizador en donde se homogeniza, luego ingresa a una celda química en donde se dosifica coagulantes y floculantes, finalmente se obtiene un efluente que deberá cumplir con los LMP y ser vertidos hacia el emisor submarino; por otro lado, los lodos resultantes son derivados a una separadora ambiental en la cual se

obtienen sólidos que son destinados a una Empresa Prestadora de Servicios de Residuos Sólidos, el efluente vuelve al tanque ecualizador (31).

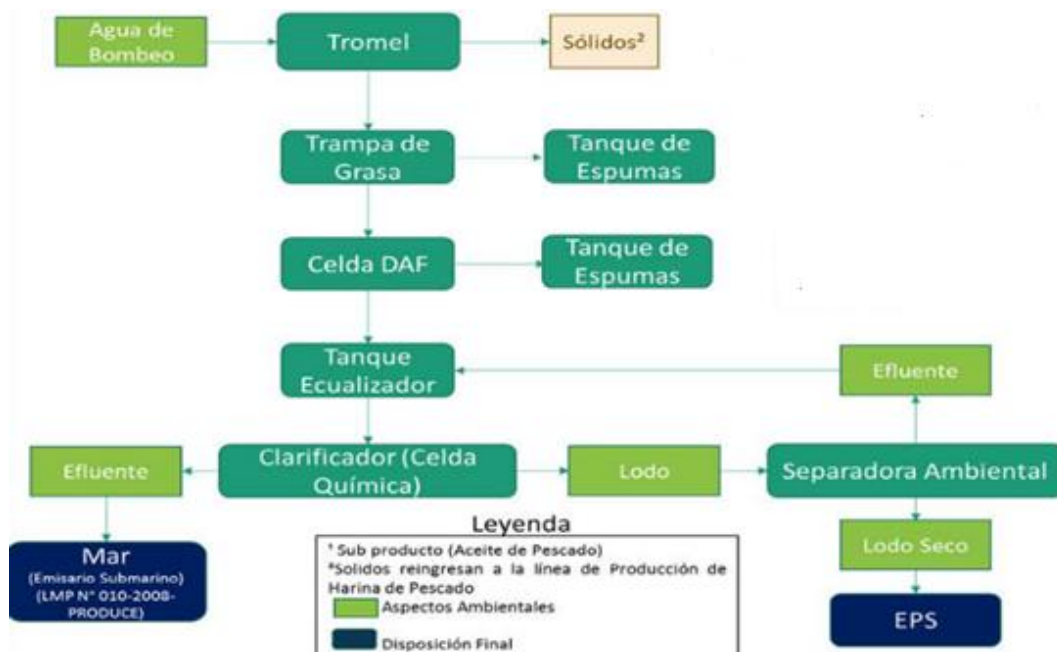


Figura N°2. Diagrama de flujo del sistema de tratamiento de efluente proveniente de agua de bombeo.

Imagen extraída de Coronado (2018).

2.8. MICROORGANISMOS MARINOS

Esta clasificación de microorganismos que se encuentran en ambientes con alto contenido de Na^+ naturales (agua de mar) están habitados por una gran variedad de microorganismos adaptados a la vida en altas concentraciones de sal; estando representados por los tres dominios de vida Archae, Bacteria y Eukarya. Estos medios suministran fuentes de nitrógeno, fosforo y materia orgánica a los microorganismos. El contenido de salinidad en el agua de mar según Stainer et. al. (1987) fluctúa entre 20 a 35‰, siendo estas condiciones favorables para microorganismos halófilos ya que le confieren rigidez a la pared celular y por el contrario si la concentración de sal disminuye, su pared disgrega monómeros protéicos produciendo lisis; entonces se concluye que la integridad estructural de estos microorganismos está asegurada a altas concentraciones de Na^+ (32).

El reconocimiento de nuevos linajes de microorganismos halófilos sobre las posibilidades de aprovechamiento de su potencial para aplicaciones de biorremediación (33). Según Madigan et. al. (2004) las bacterias marinas son de naturaleza psicrófilas, halotolerantes y barofílicas (27); sus procesos metabólicos están adaptados a bajas temperaturas y realizan sus actividades

a bajas temperaturas, altas concentraciones de sales, elevadas presiones hidrostáticas, pH alcalinos e incluso condiciones anóxicas. Bajo estas condiciones moderadamente “extremas” pueden producir una serie de metabolitos, entre ellas las enzimas extracelulares (34). Según León et. al. (2000) dentro de las enzimas extracelulares más representativas están las pectinasas, lipasas, proteasas, esterases, quitinasas, agarasas, glucamilasas y amilasas (35).

A continuación, se detallará información del microorganismo en estudio:

Aeromonas hydrophila/caviae

Según Lafit Eugén (2016) son microorganismos del género *Aeromonas*, pertenecientes a la familia *Aeromonadaceae* (36). Se caracterizan por ser bacilos Gram negativos con flagelos polares, anaerobios facultativos, oxidasa y catalasa generalmente positivos (32). Viven a en aguas frías a 4°C pero también se han logrado aislar de ambientes cálidos. A pesar de ser considerados microorganismos autóctonos del medio acuático (37) (agua dulce y marina), también se ha logrado aislarlos de alimentos, peces enfermos y sanos y diversos procesos infecciosos en humanos (38)(39).

Tal como lo describe Sánchez *et al.* (2004) es una cepa capaz de producir una serie de metabolitos, entre ellas enzimas extracelulares como lipasas y proteasas (40); que actualmente son relevantes para la utilización en procesos productivos como la industria de alimentos, bebidas, detergentes e industria del cuero. Por ello se seleccionó este tipo de microorganismos para aplicarlo como tecnología enzimática microbiana para la biorremediación de efluentes pesqueros contaminados (41).

2.9. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis consiste en la ruptura de enlaces peptídicos que unen aminoácidos que conforman las proteínas, que mediante una reacción química ácida y/o básica una molécula de agua se divide en ión hidroxilo (OH^-) y en ión hidrógeno (H^+) o hidronio (H_3O^+), estos al estar en contacto con compuestos como bases y ácidos; reaccionan dando formación, solubilidad y grado de reacción de sales (42). Para hidrolizar proteínas se usan diferentes métodos como hidrólisis química e hidrólisis enzimática, la primera usa ácidos y bases fuertes, logrando una mayor disposición de aminoácidos libres (43), mientras que la hidrólisis enzimática es un proceso controlado, bajo factores de concentración de enzima/ sustrato, temperatura, pH,

tiempo que permite producir un hidrolizado de péptidos con la composición y propiedades deseadas (44).

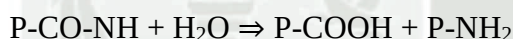
Hidrólisis enzimática de proteínas

En la industria las primeras enzimas proteolíticas utilizadas fueron las proteasas de origen animal, pero actualmente se está dando mayor importancia a las de origen bacteriano o fúngico (45). Siendo la mayoría preparaciones comerciales de proteasas de origen bacteriano, tales como la proteasa N (Amano Enzyme Inc.), alcalasas, neutrasas y Protamex (Novozymes) y algunas proteasas vegetales como la papaína y la bromelina (13).

El proceso de la hidrólisis enzimática de proteínas ocurre a través de las siguientes etapas:

Proteínas → proteosomas → peptonas → péptidos → aminoácidos

Según la siguiente ecuación la proteasa actúa sobre el enlace peptídico, rompiéndolo y liberando el grupo amino y el grupo carboxilo:



Hidrólisis enzimática de lípidos

En este caso las enzimas lipolíticas (glicerol-éster hidrolasas) catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los acilgliceroles in vivo (46). También, estas pueden catalizar la hidrólisis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos (47). Las lipasas se encuentran distribuidas en toda la naturaleza, microorganismos, animales y plantas. Estas enzimas son solubles en agua y actúan sobre sustrato insolubles y agregados, actuando unidas a interfaces lípido-agua incrementando la actividad catalítica (48). Además, su interés creciente se debe a su versatilidad, estabilidad frente a solventes orgánicos, estereoselectividad y capacidad de sintetizar compuestos orgánicos (49). Estas enzimas son empleadas ampliamente como aditivos para detergentes, en la industria papelera, alimentaria, energética y química, cosmética y en la producción de fármacos (50).

2.10. DISEÑO EXPERIMENTAL (diseño factorial)

En industria y en investigación es frecuente que se realicen cambios a las variables de entrada de un proceso para observar e identificar cambios en la respuesta de salida (51). Esto se hace con la intención de resolver un problema o comprobar una idea haciendo cambios en materiales, métodos, condiciones de operación, temperaturas de procesos, etc. con el objetivo de encontrar el mejor resultado. Sin embargo, es común que estas pruebas o experimentos sean realizados sobre la marcha, con base en el ensayo y error, apelando a la experiencia y a la intuición, en lugar de seguir un plan experimental y metodológico que garantice una buena respuesta a las interrogantes planteadas, por lo que es mejor proceder siempre en forma eficaz garantizando la obtención de las respuestas en un lapso corto de tiempo y utilizando pocos recursos. El diseño de experimentos consiste en determinar que pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolviendo un problema o logrando mejoras (52).

El diseño factorial una de las familias del diseño experimental de mayor impacto en la industria y en la investigación, debido a su eficacia y versatilidad en el desarrollo y mejora de procesos. El diseño factorial 2^k con k factores tiene dos niveles, debido a que cada replica completa del diseño tiene 2^k corridas (51); es utilizado principalmente cuando el número de factores a estudiar esta entre dos y cinco ($2 \leq k \leq 5$), rango en el cual su tamaño se encuentra entre cuatro y 32 tratamientos sin que aumente el error; esta cantidad es manejable en muchas situaciones experimentales. El diseño factorial está compuesto de diseños de tipo $2k$, $3k$ y fraccionados, donde el nombre del diseño describe el número de tratamientos a realizarse; en estos el número corresponde a los niveles de los factores y “ k ” al número de factores a emplearse (52).

2.11.1. Diseño factorial 2^2

El diseño factorial 2^2 es el más sencillo de los diseños factoriales, estudia el efecto de dos factores considerando dos niveles en cada uno. Donde la notación 2^2 el exponente es el número de factores: 2; mientras que la base indica el número de niveles también: 2. Cada réplica de este diseño consiste de $2 \times 2 = 4$ combinaciones o tratamientos que se pueden denotar de diferentes maneras. En la notación de signos $+$ y $-$ es muy práctica para escribir las matrices de diseño, combinada con la de Yates (véase en la Tabla 3) permite calcular fácilmente los efectos de interés (52).

En este diseño existen tres efectos de interés: que son los dos efectos principales (A y B) y el efecto de interacción (AB) (51). Este diseño plantea cuatro hipótesis nulas (H_0) emparejadas con sus correspondientes hipótesis alternas, que son confirmadas mediante un análisis de varianza (ANOVA). El diseño debe validarse a través del cumplimiento de los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianza (homocedasticidad), independencia y colinealidad de los factores (multicolinealidad). Además, el diseño es analizado mediante un modelo de regresión lineal múltiple a partir de los datos obtenidos en el ANOVA, obteniendo una ecuación polinomial de primer orden que predice el comportamiento de la respuesta en estudio, dentro de los niveles de los factores escogidos (área experimental) (53).

Tabla 3. Matriz del diseño factorial 2^2 .

Factor 1 (A)	Factor 2 (B)	Notación de Yates
-	-	(1)
+	-	a
-	+	b
+	+	ab

Fuente: elaboración propia (2022).

2.11.1.1. ANOVA

Interpretación:

Todos los efectos cuyo valor de probabilidad (valor-p) sea menor que el valor de significancia escogido (α) son estadísticamente significativos, aquellos que no sean significativos son ignorados y se realiza un segundo análisis de varianza conservando aquellos efectos que tenían un valor-p por debajo de α o muy cercano a este. Las repeticiones de los experimentos en los diseños factoriales, sugieren la necesidad de realizar réplicas a la matriz experimental, según lo reportado por Perochena (2019) y Gutierrez de la Vara (2012). Los efectos que explican y tienen mayor influencia sobre los procesos en estudio son los efectos principales y de interacción doble, que serán mejor observados en las gráficas de Pareto (51).

2.11.1.2. Análisis de regresión lineal múltiple

Este análisis es un modelo de regresión que ayuda a predecir o entender el mejor comportamiento de la respuesta con relación a los diferentes valores de los factores estudiados.

Sea $X_1, X_2, \dots, X_k$ variables independientes o regresoras, y sea Y una variable de respuesta, entonces el modelo de regresión lineal múltiple con k variables independientes es el polinomio de primer orden (52):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_k X_k$$

Ecuación 1.

- Coeficientes de determinación

El coeficiente de determinación o coeficiente de correlación múltiple; mide la proporción (porcentaje si es multiplicado por 100) de la variabilidad del modelo estudiado con relación a la variación total del experimento para lograr cuantificar la variabilidad en los datos obtenidos experimentalmente, que es explicada por el modelo (52)(51). Existen dos coeficientes de determinación el coeficiente de determinación (R^2) que mide la proporción de la variabilidad de la variable dependiente explicada por las variables independientes; y el coeficiente de determinación ajustada (R^2_{aj}) que mide lo mismo que la R^2 pero sin ser influenciado por el número de variables utilizadas y no crece por el error.

Según lo descrito por Gutiérrez y De la Vara (2008), estos coeficientes se calculan mediante las siguientes ecuaciones:

$$R^2 = \frac{SC_T - SC_E}{SC_T} * 100$$

$$R^2_{aj} = \frac{CM_T - CM_E}{CM_T} * 100$$

Ecuación 2.

Cuando los modelos emplean múltiples factores como es el caso del diseño factorial, es recomendable usar el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}) en vez del coeficiente de determinación (R^2), debido a que el R^2_{aj} incrementa o disminuye su valor dependiendo de si los factores aportan o no a la explicación de la respuesta. Mientras que el R^2 no varía en función al aporte de los factores para explicar la variabilidad de la respuesta estudiada; sino que tiende a incrementarse a medida que se analizan más factores, lo cual podría conducir a afirmaciones erróneas. Por ello es recomendable usar el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}), cuando

este coeficiente es igual o superior a 70% se afirma que las variables en estudio explican el comportamiento de los resultados; por el contrario, valores de R^2_{aj} menores a 70 %, indicarían que el comportamiento de los resultados podría deberse a variables fijas o nulas no incluidas en el modelo (53)(52).

2.11.1.3. Validación de los supuestos

La validez de los resultados obtenidos en cualquier ANOVA queda supeditado a que los supuestos del modelo se cumplan. Los supuestos a cumplirse son: normalidad, homogeneidad de varianza, varianza constante u homocedasticidad e independencia de los errores. Para comprobar los supuestos se utiliza la muestra de residuos ya que, si los supuestos se cumplen, los residuos o residuales se pueden ver como una muestra aleatoria de una distribución normal con media cero y varianza constante. Los residuos son la diferencia entre la respuesta observada y la respuesta predicha por el modelo; permitiendo hacer un análisis directo de la calidad del modelo.

- Normalidad

Indica si el comportamiento de los datos analizados representa una población normal. Se analiza mediante el método de Anderson-Darling cuyo valor debe ser mayor al valor de significancia establecido ($\alpha > 0.05$) (52).

- Homogeneidad de varianzas

Este supuesto verifica que todos los tratamientos experimentales tengan la misma varianza sin que afecte la varianza del error. Se verifica este supuesto con la prueba de Bartlett una vez que se haya cumplido el supuesto de normalidad (52). Es válido cuando el valor de probabilidad es mayor al establecido ($\alpha > 0.05$) (51).

- Independencia de los errores

El supuesto de independencia de los errores indica si se llegó a aplicar erróneamente el principio de aleatorización en las pruebas experimentales y si las variables o factores nulas o fijas intervinieron en la respuesta de estudio (51); además de encargarse de evaluar diferencias en la ejecución del experimento (52). Se puede verificar este supuesto mediante el método gráfico que está distribuido de la siguiente manera: en el eje horizontal se ubica el tiempo y en el eje vertical los residuos. Este supuesto se cumple cuando se observa que los errores se distribuyen aleatoriamente sin formar una tendencia o patrón (51) (52).

2.11.2. Prueba de Tukey Kramer

Es un método de análisis comparativo utilizado conjuntamente con ANOVA; con la finalidad de crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores mientras se controla la tasa de error por familia en un nivel especificado (51) dado con el siguiente valor crítico:

$$T_{\alpha} = q_{\alpha}(k, N - k) \sqrt{CM_E \ln_i}$$

Ecuación 3.

Donde: CM_E es el cuadrado medio del error, n es el número de observaciones por tratamiento, k es el número de tratamientos, $N - k$ es igual a los grados de libertad para el error, α es el nivel de significancia prefijado y el estadístico $q_{\alpha}(k, N - k)$ son puntos porcentuales de la distribución del rango estudentizado (52).

A diferencia de otros métodos como LSD y Duncan, este método trabaja con un error α muy cercano al establecido por el experimentador (52); para este estudio el conjunto de comparaciones tubo una tasa de error por familia de 0.05 (equivalente a un nivel de confianza de 95%).

CAPÍTULO III:

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología y Laboratorio de Fisicoquímica del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) – Callao–Perú, como parte del proyecto de investigación aplicada N° 161-2017-FONDECYT, financiado por FONDECYT del CONCYTEC.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Material biológico:

- Cepas proteolíticas y lipolíticas: BG18 01, BG18 03, BG18 07 y BL18 06.
- Efluente pesquero agua de bombeo.

3.2.2. Material de vidrio:

- Placas Petri (100 x 15 mm)
- Tubos de ensayo con tapa rosca (10 x 100 mm)
- Tubos de ensayo con tapa (15 x 150 mm)
- Viales de vidrio con tapa rosca (14 x 54 mm)
- Tubos de centrifuga de 50 mL
- Láminas porta objetos (25 x 75 mm)
- Gradillas
- Botellas de autoclave 500 mL
- Botellas de autoclave 250 mL
- Botellas de autoclave 80 mL
- Espátulas de Drigalsky
- Pipetas Pasteur
- Erlenmeyer o matraz de 150 mL

3.2.3. Insumos y reactivos:

- Medio agar nutritivo
- Medio agar TSA (Tryptic Soy Agar)

- Caldo TSB (Tryptic soy broth)
- Caldo LB (Luria Bertani)
- Tributirina
- Gelatina
- Leche descremada
- Solución salina 0.85%
- Solución bicloruro de mercurio
- N,N,N,N,-tetrametil-p-fenilendiamina
- Tiras para oxidasa
- Fosfato de potasio KH_2PO_4
- Fosfato dipotásico K_2HPO_4
- Fosfato de disódio $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Cloruro de amonio NH_4Cl
- Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Cloruro de calcio CaCl_2
- Cloruro de hierro FeCl_3
- Cloruro de sodio NaCl
- Escala de McFarland 0.5
- Kit API 20 NE:
 - Ampolla de API AUX Medium
 - Reactivo NIT 1 y NIT 2
 - Reactivo Zn
 - Reactivo JAMES
- Aceite parafina
- Alcohol 70°
- Alcohol acetona
- Agua destilada
- Safranina
- Alcohol acetona
- Lugol
- Cristal violeta
- Aceite de inmersión
- Tris HCl pH 7.8

- Peptona
- Buffer Tris-HCl 50Mm
- TCA 50%
- Tripsina

3.2.4. Instrumentos y Equipos:

- Micropipeta de 0.5-10 μ l
- Micropipeta de 50-200 μ l
- Micropipeta de 100-1000 μ l
- Hisopos estériles
- Asas de siembra
- Pipeta de vidrio de 10 ml
- Pipeta de vidrio de 25 ml
- Mechero
- pH metro, JENWAY 3510
- Moledora de laboratorio, Retsh GM 200
- Baño maría, J. P Selecta
- Horno microondas, Samsung, MG402MADXBB
- Estufa, Binder moderlo ED-115
- Autoclave para material limpio (Yamato Scientific, SM510)
- Autoclave para material sucio (Yamato Scientific, SM510)
- Refrigeradora
- Balanza analítica, Ohaus
- Centrífuga refrigerada para microtubos, Eppendorf
- Centrífuga refrigerada para tubos de 50ml, Eppendorf
- Incubadora
- Incubadora con agitador orbital, Thermocientific
- Mechero
- Oxímetro
- Espectrofotómetro, Shiamatzu

3.2.5. Otros:

- Puntas para micropipeta de 10 μ l
- Puntas para micropipeta de 100 μ l

- Puntas para micropipeta de 1000 μ l
- Algodón (hidrófilo)
- Encendedor
- Piceta

3.3. MÉTODOS

Las cepas utilizadas en el presente estudio fueron aisladas a partir del efluente agua de bombeo proveniente de una empresa pesquera, colaboradora del ITP.

3.3.1. Aislamiento de bacterias con capacidad proteolítica y lipolítica del efluente agua de bombeo

3.3.1.1. Toma de muestra

Las muestras del efluente fueron tomadas durante la descarga de pescado en frascos estériles de 500 mL de capacidad tal como lo señala el Protocolo para el Monitoreo de Efluentes de los Establecimientos Industriales Pesqueros de Consumo Humano Directo e Indirecto (54).

Las muestras de color marrón negruzco con alto contenido de sólidos en suspensión fueron refrigeradas y transportadas al Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de la Producción en el Callao. Las mismas fueron guardadas en botellas de polietileno estériles en congelación hasta su uso en los bioprocesos.

3.3.1.2. Aislamiento de cepas con capacidad enzimática

Las muestras del efluente fueron procesadas en el laboratorio donde se colocó 50 mL de agua de bombeo en un frasco de vidrio de 1L de capacidad con 500 mL de caldo TSB y se incubó a 35°C 180 rpm durante 24 horas.

Luego, en un tubo de ensayo se colocó 1 ml del cultivo en 9 mL de NaCl 0.85%, se homogenizó y se comparó, hasta alcanzar una turbidez equivalente a una Escala de McFarland 0.5. Seguido se preparó diluciones decimales hasta alcanzar concentraciones de 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} (27).

Para obtener colonias puras del efluente agua de bombeo se aplicó el método de recubrimiento completo (32) también conocido como extensión en superficie. Se tomó alícuotas de 100 μ l de cada una de las diluciones 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} y se extendió en la superficie de placas TSA, Agar Caseína, Agar Tributirina y Agar Gelatina, con la ayuda de una espátula de Drigalsky. Las placas fueron invertidas e incubadas a 35°C durante 24 horas.

Las colonias con mayor diámetro de halo de transparencia fueron colocadas en un tubo con TSB estéril y dejadas incubando a 35°C por 24 horas. Luego se tomó una muestra con una asa y se estrió en la superficie (27) de los medios Agar caseína y Agar gelatina las colonias con capacidad proteolítica y en Agar tributirina aquellas con capacidad lipolítica.

3.3.2. Caracterización de bacterias con mejor capacidad de hidrólisis para proteasas y lipasas

3.3.2.1. Pruebas de actividad enzimática mediante ensayo en placa

La actividad enzimática de las cepas proteolíticas y lipolíticas aisladas fue determinada mediante ensayo en placa.

Para verificar la producción de las enzimas extracelulares tipo proteasas y lipasas de las cepas bacterianas aisladas, se realizó los siguientes ensayos específicos:

- Hidrólisis de tributirina para cepas lipolíticas.
- Hidrólisis de caseína y gelatina para cepas proteolíticas.

a) Hidrólisis de tributirina

Para determinar la producción de enzimas extracelulares tipo lipasas, se colocó 5ul de un cultivo joven (24 horas) en una placa con agar tributirina (por duplicado). Las placas fueron monitoreadas durante 5 días de incubación a 30°C, tras lo cual fueron analizadas.

Se confirmó la actividad lipolítica, cuando se observó un halo de transparencia alrededor de la colonia.

b) Hidrólisis de caseína

Para determinar la producción de enzimas extracelulares tipo proteasas, se colocó 5 µl de un cultivo joven (24 horas) en una placa con agar Leche (por duplicado). Las placas fueron monitoreadas durante 5 días de incubación a 30°C, posterior a ello fueron analizadas. Se confirmó la actividad proteolítica, cuando se observó un halo de transparencia alrededor de la colonia.

c) Hidrólisis de gelatina

Para determinar la producción de las enzimas extracelulares tipo proteasas, se colocó 5 µl de un cultivo joven (24 horas) en una placa con agar gelatina (por duplicado). Las placas fueron monitoreadas diariamente durante 5 días de incubación a 30°C. Al quinto día, las placas fueron

bañadas con una solución de bicloruro de mercurio (HgCl_2) acidificado (HCl). Se confirmó la actividad proteolítica, cuando se observó un halo de transparencia alrededor de la colonia.

3.3.2.2. Pruebas de caracterización microbiana

3.3.2.2.1. Prueba de Catalasa

Para determinar la producción de catalasa por parte de las cepas bacterianas aisladas de agua de bombeo, se agregó unas gotas de solución de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3% (v/v) a una colonia proveniente de un cultivo joven. La presencia inmediata de burbujas efervescentes indicó una reacción positiva (32).

3.3.2.2.2. Prueba de Oxidasa

La producción de oxidasa se determinó por dos métodos; para el primero se colocó un inóculo de cultivo joven sobre una tira reactiva para oxidasa mientras que en el segundo método se depositó una gota de N,N,N,N,-tetrametil-p-fenilendiamina sobre el cultivo. Se leyó como una reacción citocromo - oxidasa positiva cuando se observó la formación de un compuesto oxidado de color violáceo (32).

3.3.2.2.3. Tinción Gram

Se seleccionó una cepa pura de un cultivo joven (24 ± 2 horas) en agar TSA de las cepas BG18 01, BG18 03, BG18 07 y BL18 06; luego, en esterilidad se tomó una colonia en presencia de 10 μl de NaCl 0.85%, se expandió sobre la superficie de una lámina porta objetos formando una fina película y se dejó secar. La lámina fue colocada en un soporte y se cubrió toda la superficie de esta con cristal violeta durante un minuto, se lavó con abundante agua. Luego se aplicó una solución de Yodo (Iugol) por un minuto y se lavó con agua destilada; se decoloró la lámina con etanol al 95% durante 30 segundos hasta eliminar el color azul; inmediatamente se enjuagó con agua destilada; se añadió unas gotas de solución de safranina por 30 segundos, se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, las láminas fueron observadas al microscopio a 40X y 100X de aumento (55).

3.3.2.2.4. Identificación bioquímica mediante el sistema API 20 NE

Las cepas que resultaron bacilos Gram negativos y oxidasa negativo, fueron seleccionadas para identificación en la galería API 20 NE. El kit de identificación para bacterias Gram negativas fue separado en 7 grupos de tres pocillos cada uno; de los cuales 8 fueron ensayos convencionales y 12 fueron ensayos de asimilación.

Se rotuló cuatro galerías para las cepas BG18 01, BG18 03, BG18 07 y BL18 06; luego se añadió aproximadamente 5 mL de agua destilada en la base de cada galería para crear una atmosfera húmeda.

- Preparación de las colonias

Se preparó una suspensión con una a dos colonias de un cultivo joven (18-24 horas, en tubos de ensayo con 2 mL de NaCl 0.85%), se agitó en vortex y se verificó una turbidez equivalente a 0.5 en la escala McFarland (56).

- Inoculación de la galería

Se añadió el inóculo a los tubos NO3 hasta PNPG. Luego, se agregó 200 μ l del inóculo en una ampolla API AUX Medium, se homogenizó y se llenó los tubos hasta las cúpulas de los pocillos desde GLU a PAC. Se cubrió con aceite de parafina las cúpulas de los pocillos GLU, ADH y URE. Finalmente se dejó incubar por 24 horas ($\pm$ 2 horas) a $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (56).

3.3.3. Bioensayos de hidrólisis enzimática

3.3.3.1. Diseño de los frascos de Biorreacción

Para la etapa de biorreacción se utilizó frascos de vidrio de 500 mL de capacidad, resistentes a la presión y calor. Fueron contruidos siguiendo el modelo propuesto por Perochena (2019) se adaptó un ingreso para el oxígeno, inóculo y salida de gases tal como se ve en la figura 3. Para la entrada del inóculo se utilizó una llave de venocllisis de tres vías, con la finalidad que se mantuviera la esterilidad del sistema durante los procesos evitando una contaminación cruzada.

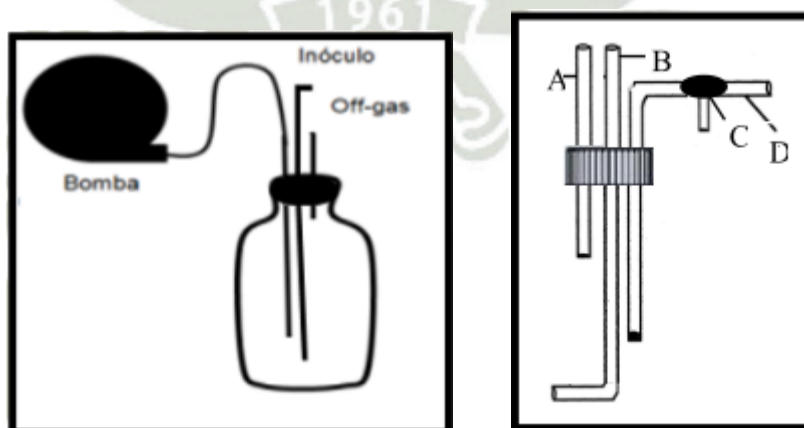


Figura N°3. Representación grafica de los frascos de biorreacción y sus partes. A: salida de CO₂, B: ingreso de Oxígeno, C: llave de venocllisis de tres vías y D: ingreso de inóculo.

Imagen extraída de Perochena (2019).

3.3.3.2. Bioensayos de hidrólisis enzimática (Biorreacción)

3.3.3.2.1. Preparación de los sustratos de agua de bombeo M1 y M7

Según reportes de Alexandre *et. al.* (2011), Azad *et. al.* (2001) y Marín *et. al.* (2015) los efluentes usados como sustrato son fuente de nitrógeno y carbono para el desarrollo de los microorganismos en estudio (19)(57)(24); por ello se preparó dos sustratos diferentes para los bioprocesos de hidrólisis enzimática de proteasas y lipasas:

- **Efluente sustrato para hidrólisis proteolítica (M1)**

El sustrato que se utilizó para todos los bioensayos (con cepa bacteriana, enzima comercial PROTAMEX y controles) fue agua de bombeo original sin ningún tipo de tratamiento.

- **Efluente sustrato para hidrólisis lipídica (M7)**

El sustrato utilizado; fue agua de bombeo esterilizada previamente a los bioensayos con la cepa bacteriana, con la enzima comercial BUZYME 7707 y controles.

3.3.3.2.2. Desproteínización del efluente agua de bombeo (M1)

Para los bioprocesos de hidrólisis proteolítica se utilizó la cepa BG18-03. Esta se sembró en caldo TSB por 24 horas, tras lo cual una alícuota de esta (1.5 mL) a una concentración de 10^8 UFC/mL fue inoculada en 150 mL del sustrato a biorremediar (M1). Las muestras estuvieron contenidas en sistemas de biorreacción de 500 mL de capacidad que contenían tres entradas: para el ingreso del oxígeno, inóculo bacteriano y otra para la salida de CO_2 . Las condiciones de operación para estos sistemas de biorreacción fueron (Tabla 4) de 180 rpm con un flujo de aire de 0.25 vvm por un tiempo y temperatura de proceso predeterminado (8 y 24 horas; 20 y 35°C) definidos en el diseño experimental de tipo factorial, tal como se observa en la Figura 4. Pasado los tiempos de proceso (8 y 24 horas) se detuvo las biorreacciones y se llevó a esterilización por calor húmedo. Luego se vertió el contenido de los envases en tubos cónicos de 50 mL y fueron refrigerados a 4°C para posteriormente realizarles los análisis de caracterización (2).

Tabla 4. Condiciones de Operación de los sistemas de biorreacción durante los bioprocesos de hidrólisis enzimática de proteínas.

Condiciones de Operación	
Temperatura de biorreacción (°C)	20 y 35 (Diseño factorial 2^k)
Tiempo de biorreacción (horas)	8 y 24 (Diseño factorial 2^k)
Aireación (vvm)	0.25
Agitación (rpm)	180
Volumen de Inóculo (10^8 UFC/mL)	1.5
Cantidad de PROTAMEX (mg) para controles con enzima.	0.96
Volumen de sustrato AB (mL)	150
Relación altura/diámetro (H/D)	2

Fuente: elaboración propia (2022).

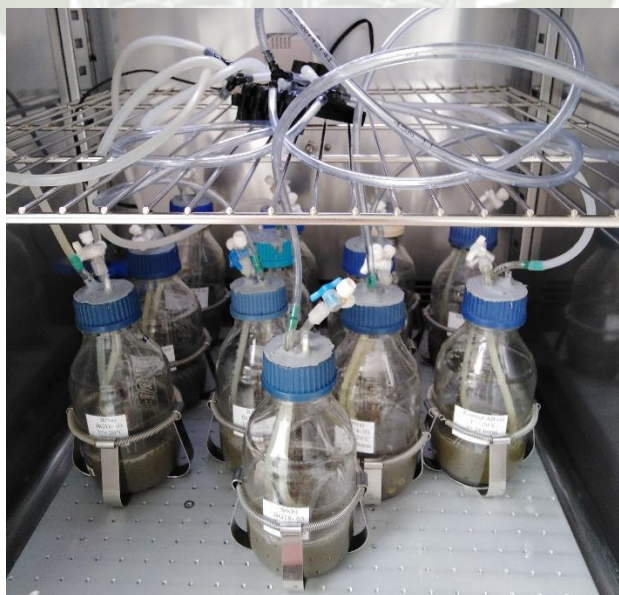


Figura N°4. Sistema de biorreacción para desproteínizar el sustrato agua de bombeo M1.

3.3.3.2.3. Deslipidificación del efluente agua de bombeo (M7)

La cepa BL18-06 fue utilizada en los bioprocesos de hidrólisis lipolítica. Esta cepa fue sembrada en caldo TSB por 24 horas, tras lo cual una alícuota de esta (1.5 mL) a una concentración de 10^8 UFC/mL fue inoculada en 150 mL del sustrato a biorremediar (M7). Las muestras estuvieron contenidas en sistemas previamente explicados en la desproteización, las condiciones de operación para estos sistemas de biorreacción fueron (Tabla 5) de 180 rpm con un flujo de aire de 0.25 vvm por un tiempo y temperatura de proceso predeterminado (8 y 24 horas; 20 y 35°C) definidos en el diseño experimental de tipo factorial tal como se ve en la Figura 5. Una vez concluidos los procesos todos los sistemas fueron esterilizados por calor húmedo a 121°C por 15 min. Luego las soluciones obtenidas fueron almacenadas en tubos cónicos de 50 mL a 4°C para posterior caracterización (2).

Tabla 5. Condiciones de Operación de los frascos de biorreacción durante los bioprocesos de hidrólisis enzimática de lípidos.

Condiciones de Operación	
Temperatura de biorreacción (°C)	20 y 35 (Diseño factorial 2^k)
Tiempo de biorreacción (horas)	8 y 24 (Diseño factorial 2^k)
Aireación (vvm)	0.25
Agitación (rpm)	180
Volumen de Inóculo (10^8 UFC/mL)	1.5
Volumen de BUZYME 7707 para controles con enzima (mL)	1.12
Volumen de sustrato AB (mL)	150
Relación altura/diámetro (H/D)	2

Fuente: elaboración propia (2022).



Figura N°5. Sistema de biorreacción para deslipidificar el sustrato agua de bombeo M7.

3.3.4. Caracterización de las muestras obtenidos de los bioprocesos

3.3.4.1 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅)

La DBO₅ es un ensayo considerado un indicador para determinar la concentración de materia orgánica en aguas residuales y tiene por finalidad medir la cantidad de oxígeno utilizado por los microorganismos durante la estabilización de la materia orgánica biodegradable en condiciones aeróbicas, en un periodo de cinco días a 20°C (22).

El ensayo fue realizado según el método estándar (58) dividiendo el procedimiento en las siguientes etapas,:

- Preparación de reactivos:

Buffers:

- Buffer fosfato: se pesó 0.85 g de KH₂PO₄, 2.175 g de K₂HPO₄, 2.22g de Na₂HPO₄ 2H₂O y 0.17 g de NH₄Cl; se disolvió en agua destilada medida hasta el aforo en una fiola de 100 mL.
- Sulfato de magnesio: se disolvió 2.25 g de MgSO₄ 7h₂O en agua destilada medida hasta el aforo en una fiola de 100 mL.
- Cloruro de calcio: se disolvió 2.75 g de CaCl₂ en agua destilada medida hasta el aforo en una fiola de 100 mL.
- Cloruro férrico: se disolvió 0.025 g de FeCl₃ en agua destilada medida hasta el aforo en una fiola de 100 mL.

- **Preparación del agua de dilución:**

El agua de dilución fue preparada agregando 5 mL de cada uno de los buffers previamente preparados (buffer fosfato, solución MgSO_4 , solución FeCl_3 y solución CaCl_2) en 5 L de agua destilada manteniendo una relación 1 mL/ 1 L. Luego, el agua de dilución fue saturada con aire comprimido durante 1 hora utilizando un aireador de 0.25 vvm (volumen de aire/volumen de medio x minuto).

- **Preparación de la muestra:**

Se midió 10 mL de la muestra (agua de bombeo y productos hidrolizados), se vertió en una fiola y enrasó hasta 250 mL con agua destilada y se llevó a pH 7.

Observación: la mayoría de las muestras crudas se encontraban a $\text{pH } 6 \pm 0.5$.

- **Preparación de diluciones:**

A partir de la muestra preparada en el paso anterior, se hizo dos diluciones de 0.01% y 0.017% utilizando el agua de dilución en botellas Winkler.

Luego se calibró el oxímetro, equipo que mide los valores iniciales y finales de DBO. Se midió la DBO_5 inicial de cada muestra con sus respectivos blancos, luego se cerró con una tapa de vidrio en cada botella evitando formar burbujas y el ingreso de aire; finalmente se dejó incubando durante 5 días a 20°C en completa oscuridad.

3.3.4.2. Determinación de humedad (%H), contenido de grasa cruda (%G) y proteína (%P).

Se determinó el contenido inicial y final de humedad (%H), grasa cruda (%G) y proteína (%P) de todas las muestras de los bioprocesos de hidrólisis enzimática (desproteínización y deslipidificación).

Los ensayos fueron realizados según los métodos descritos por la FAO, 1983 (59).

3.3.4.3. Análisis del contenido de humedad (%H): método gravimétrico modificado

Se pesó 2 ± 0.1 g de las muestras (agua de bombeo y productos hidrolizados), en un pesa filtro (PF) por duplicado y se llevó a una estufa a 60°C por 24 horas. Luego fue desecado por 30 minutos y finalmente pesado (60). El porcentaje de humedad fue determinado según la siguiente ecuación:

$$\%H = \left[\frac{PF \text{ con muestra húmeda} - PF \text{ con muestra seca}}{\text{peso muestra}} \right] \times 100$$

Ecuación 4.

3.3.4.4. Análisis del contenido de grasa cruda (%G): método de extracción en Soxhlet modificado (Gerhardt)

Se pesó 10 ± 0.1 g de muestra, se colocó en una estufa a 130°C por dos horas, se retiró la muestra y se colocó en un desecador. Luego el contenido se traspasó a otro contenedor y pesó (21). Se enrolló la muestra tratada en un papel filtro, colocó en un tubo (TE), adicionó 40 ml de hexano y se colocó en el equipo Soxhlet (Gerhardt) durante 6 a 8 horas. Finalizada la extracción, el TE fue instalado en un desecador durante 30 minutos y se pesó hasta obtener un peso constante (60).

El contenido de grasa cruda fue determinado según la siguiente ecuación:

$$\%G = \left[\frac{\text{Peso TE con grasa} - \text{Peso TE solo}}{\text{peso muestra seca}} \right] \times 100$$

Ecuación 5.

3.3.4.5. Análisis de proteína (%P) método semi micro Kjeldahl

Se pesó 10 ± 0.1 g de muestra, se añadió 20 mL de ácido sulfúrico y 15 g de catalizador. Luego se digirió en un equipo Kjeldahl hasta que alcanzó un color transparente y se dejó enfriar al ambiente. Luego se transfirió a una fiola de 100 mL y se enrasó con agua destilada. Se transfirió 5 mL de la solución digerida a un tubo de Kjeldahl y se añadió 5 mL de hidróxido de sodio al 40%. Luego se colocó en un destilador de Kjeldahl y se recibió en un Erlenmeyer de 100 mL el cual contenía 5 ml de ácido sulfúrico 1N con 6 a 8 gotas de indicador de Tashiro. Finalmente se tituló con hidróxido de sodio 0.02N hasta que se alcanzó un color verde botella (60).

El contenido de proteína fue determinado con la siguiente ecuación:

$$\%P = \left[\frac{(Gb - Gm) * N * F * Fd * 14 * 100}{Pm * 1000} \right] * 6.25$$

Ecuación 6.

Donde: Gb es el gasto del blanco; Gm es el gasto de la muestra; N es la normalidad del NaOH (0.02); F es el factor del NaOH (1.0119); Fd es el factor de dilución (5 mL de destilado en 100 mL), Pm es el peso de la muestra y 6.25 es el factor de conversión de nitrógeno a proteína.

3.3.5. Diseño experimental y Análisis Estadístico

Se aplicó un diseño experimental tipo factorial 2^2 que permitió medir el efecto singular y de interacción de cada variable con relación a los resultados de porcentaje de desproteinización (reducción del contenido de proteína) y deslipidificación (reducción del contenido de lípidos) en los sustratos M1 y M7. Este diseño permitió estimar las mejores condiciones de operación, así como evaluar los bioprocesos de hidrólisis. El análisis de los resultados fue realizado mediante ANOVA y una regresión lineal múltiple (52). Los porcentajes de desproteinización y deslipidificación obtenidos de cada bioproceso, se compararon con respecto a sus controles positivos y negativos, mediante un ANOVA de una sola vía, comparaciones múltiples de Tukey-Kramer y con la Prueba no paramétrica de la Mediana de Mood. El proceso de análisis de los datos fue realizado con el programa estadístico Minitab 18.

3.3.5.1. Diseño factorial 2^2

El diseño factorial en este estudio considero la evaluación de 2 variables: Tiempo (A) y Temperatura (B) de proceso. Las variables del diseño fueron estudiadas en 2 niveles (-1,+1), teniendo en cuenta las recomendaciones de Gutiérrez y De la Vara (2012) y de Montgomery (2009). La Tabla 6 muestra los valores en cada nivel de las variables experimentales.

Tabla 6. Variables experimentales y niveles usados para el diseño factorial 2^2 .

Variables	Unidades	Niveles de las variables en estudio	
		-1	+1
Tiempo (A)	Horas	8	24
Temperatura (B)	°C	20	35

Fuente: elaboración propia (2022).

Dada la linealidad entre los niveles extremos para este tipo de diseño, se realizó una matriz de 8 ensayos a realizar con dos variables. Donde se estudia 7 efectos, dos efectos principales (A y B) y dos variables de interacción (AB) tal como se observa en la Tabla 7 y Anexo 1.

Tabla 7. Matriz experimental del diseño factorial 2² para el trabajo en estudio.

Ensayo	A: Tiempo (Horas)	B: Temperatura (°C)	Combinaciones de tratamientos (notación de Yates)
1	8	20	(1)
2	24	20	a
3	8	35	b
4	24	35	ab
5	8	20	(1)
6	24	20	a
7	8	35	b
8	24	35	ab

Fuente: elaboración propia (2022).

* La notación de Yates según lo descrito por Gutiérrez y De la Vara (2008) representa el total o la suma de las observaciones en cada tratamiento, más que el tratamiento mismo. Interpretándose en letras minúsculas cuando el factor o factores se encuentran en su nivel alto.

3.3.5.2. Análisis del Diseño Factorial

Para este estudio se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para ambas cepas bacterianas (BG18-03 y BL18-06); donde se evaluó el efecto principal y de interacción de las variables en estudio sobre el porcentaje de desproteinización y deslipidificación. Según el ANOVA los efectos serían significativos cuando el valor de probabilidad (valor p) fuera menor al valor de significancia determinado ($\alpha = 0.05$) y así saber cuál fue el mejor tratamiento. Además, según el ANOVA la variable respuesta tiene que distribuirse de manera normal, con varianza constante y con mediciones independientes entre sí. Los supuestos sobre los residuos fueron validados: normalidad, varianza constante (homocedasticidad) e independencia de los errores.

3.3.5.3. Regresión lineal múltiple

Mediante el análisis de regresión múltiple; se obtuvo una ecuación polinomial de primer orden para poder predecir el porcentaje de desproteinización y deslipidificación dentro de los niveles escogidos para cada variable. Se evaluó la influencia de las variables tiempo y temperatura sobre las variables respuesta (DBO₅, %DP y %DL). Representado con el siguiente modelo de ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2$$

Donde Y es igual al porcentaje de desproteinización y deslipidificación; β_0 es el termino independiente; β_1, β_2 son los coeficientes de regresión lineal; X_1, X_2 son las variables en estudio Tiempo y Temperatura. Se ajustó la ecuación polinomial en relación a los datos obtenidos experimentalmente y se evaluó según los coeficientes de determinación (R^2) y ajustado (R^2_{aj}).



CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento, purificación e identificación de cepas bacterianas marinas del efluente agua de bombeo

4.1.1. Caracterización de la muestra (sustrato M1 y M7)

La muestra de agua de bombeo sin ningún tratamiento, obtenida de la planta procesadora de harina y aceite de pescado tenía fuertes olores sulfurosos, así como un color marrón con sedimentos negruzcos y un alto contenido de sólidos en suspensión. El agua de bombeo utilizada para los procesos de desproteinización (M1) se muestra en la Figura N°6; contenía valores de 29.19% de grasas, 35.43% de proteínas, una DBO_5 inicial de 8945 mg/L y una salinidad de 56%. Mientras que el sustrato que se utilizó para los procesos de deslipidificación se muestra en la Figura N°7; contenía 24.28% de grasa, 29.5% de proteína, una DBO_5 inicial de 8257.5 mg/L y una salinidad de 40%. Asimismo, Marín y colaboradores (2015) y Azad y colaboradores (2001) reportaron que durante la etapa de tratamiento de este efluente para sus ensayos de biorremediación; este fue diluido con agua destilada debido a la gran cantidad de carga orgánica y sólidos en suspensión que contenía (19)(57).



Figura N°6. Agua de bombeo (AB) M1 utilizada para los procesos de desproteinización. Fuente: elaboración propia (2022).



1° se hirvió
2° se recuperó el sobrenadante



Figura N°7. Sustrato (AB) M7 utilizado para los procesos de deslipidificación. Fuente: elaboración propia (2022).

4.1.2. Aislamiento, purificación e identificación de cepas bacterianas marinas del efluente agua de bombeo

A partir de un primer cultivo de la muestra en 500 mL de caldo TSB (Figura N°8), se sembró una alícuota mediante el método de extensión en superficie y se observó el crecimiento de diferentes colonias proteolíticas en los medios con agar leche y agar gelatina, así como una variedad de colonias lipolíticas en el medio agar tributirina (Figura N°9).

Durante la selección de cepas, se consideraron como candidatas aquellas cepas con el mayor halo de transparencia y se escogió como las más proteolíticas a las cepas BG18-03 y la BG18-07 (Figura N°10); y como las más lipolíticas a las cepas BL18-06 y la BG18-01 (Figura N°11). En total fueron elegidas 4 cepas como candidatas para purificación.

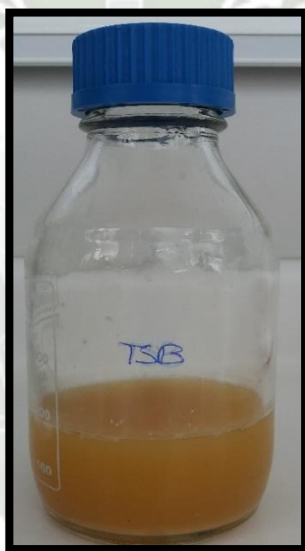


Figura N°8: Muestra de agua de bombeo incubada en 500 ml de caldo TSB.

Fuente: elaboración propia (2022).



Figura N°9: Colonias aisladas del agua de bombeo en la dilución 10^{-8} en placa agar gelatina.

Fuente: elaboración propia (2022).

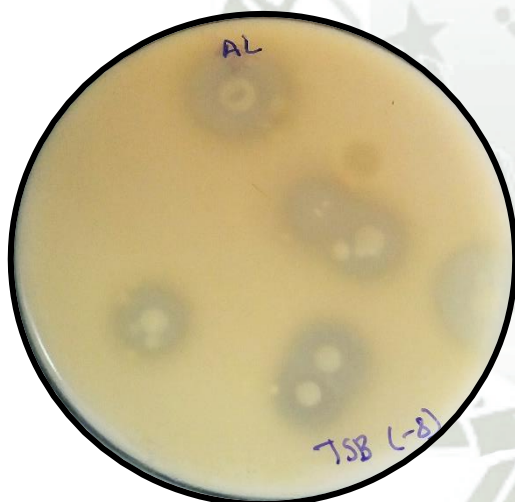


Figura N°10. Placa de las cepas con capacidad proteolítica en medio agar leche.

Fuente: elaboración propia (2022).

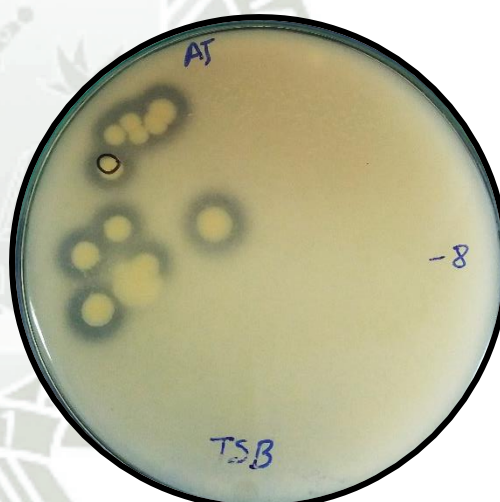


Figura N°11. Placa de las cepas con capacidad lipolítica en medio agar tributirina.

Fuente: elaboración propia (2022).

4.2. Caracterización microbiana y pruebas de actividad enzimática en placa

4.2.1. Pruebas de capacidad enzimática en placa

Se observó durante el ensayo en placa después de 24 y 48 horas la formación de un halo de transparencia de las cepas con capacidad de hidrolizar lípidos y proteínas.

La cepa BG18-03 presentó un halo de 60 mm en Agar gelatina y de 50 mm en Agar leche (Tabla 8). Mientras que la cepa BG18-07 presentó un halo de 55 mm en Agar gelatina y de 47 mm en Agar leche (Figura N°12). Para el caso de las cepas lipolíticas; la cepa BL18-06 formó un halo de 11 mm en Agar tributirina y la cepa BG18-01 un halo de 29 mm ver Figura N°13.

Tabla 8. Tamaño de halo de transparencia de cepas proteolíticas y lipolíticas en Agar gelatina, Agar leche y Agar tributirina.

		Tamaño del diámetro del halo de transparencia (mm)		
	Cepa	AG	AL	AT
Proteolíticas	BG18-03	60	50	17
	BG18-07	55	47	26
Lipolíticas	BL18-06	57	47	11
	BG18-01	51	48	29

Fuente: elaboración propia (2022).

Para verificar que fueron cepas diferentes se realizó un análisis ANOVA de una vía y un Tukey Kramer. Sin embargo, los resultados indicaron que los supuestos de normalidad, homocedasticidad (igualdad de varianzas) e independencia de los errores no se cumplían. Esto pudo deberse a que el ensayo en placa mide la capacidad enzimática mas no la actividad enzimática de los mismos por lo cual el comportamiento no puede ser predicho con exactitud. Por ello se realizó un análisis no paramétrico de tipo Krustal-Wallis con el cual detectamos que la cepa BG18-03 Y BG18-07 eran diferentes entre sí. El análisis sobre la respuesta halo en Agar leche indicó que había una diferencia de medias siendo el valor p obtenido de 0.083 mayor al valor de significancia (0.05) por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta que las cepas son diferentes entre sí. De igual manera en el análisis sobre la respuesta halo en Agar gelatina

había una diferencia de medias siendo el valor p obtenido de 0.083 mayor a 0.05 por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta que las cepas son diferentes entre sí.

Por ultimo para los resultados obtenidos en agar tributirina se buscó determinar si las cepas BL18-06 y BG18-01 era diferentes; para ello se realizó un ANOVA seguido de un Tukey Kramer. Sin embargo, los resultados indicaron que los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los errores no se cumplían. Esto pudo deberse de igual manera a que el ensayo en placa mide la capacidad enzimática mas no la actividad enzimática por lo cual el comportamiento no puede ser predicho con exactitud. El ensayo no paramétrico de Krustal-Wallis se detectó que la cepa BL18-06 y BG18-01 eran diferentes entre sí; siendo el valor p obtenido del análisis de 0.083 mayor al valor de significancia escogido de 0.05, por lo cual se acepta que las cepas son significativamente diferentes entre sí.

Por su parte, Sánchez *et al.* (2004), realizaron estudios de aislamiento de bacterias (25°C durante 96 horas) en ambientes marinos encontrando bacterias proteolíticas halotolerantes a concentraciones de NaCl (0-10%) en agar marino, con un crecimiento óptimo en NaCl (0-9%) de bacterias *Alcaligenes sp.* y *Aeromonas sp.* con tamaños de los halos de actividad entre 10 - 20 mm; a diferencia de la cepa *Pseudomona sp.* que mostró el mejor halo de actividad de 25 mm de diámetro y solo creció a concentraciones de NaCl (3-10%) considerándose como una cepa autóctona de ambientes marinos. En este trabajo la cepa BG18-03 mostró un halo de actividad de 60 mm en agar gelatina con NaCl 12%, siendo este valor mayor a los comentados anteriormente (41).

Por otro lado, estudios realizados por Flores *et al.* (2010), reportaron que lograron aislar bacterias halotolerantes con actividad lipolítica en un medio de sales al 5% conteniendo tributirina, Tween 80 y aceite de oliva al 1%. Creciendo óptimamente bacterias en medios con y sin sales, mostrando un tamaño de halo que oscilaba entre 3 a 9 mm en medio agar tributirina a concentraciones de NaCl (0-25%) a temperatura 37°C. Por el contrario, en este trabajo la cepa BL18-06 mostró un mejor halo actividad, siendo este de 11 mm en medio agar tributirina sin sales (61).

Resultados similares fueron obtenidos por León *et al.* (2000) donde analizaron un conjunto de bacterias marinas productoras de enzimas extracelulares aisladas de especies de invertebrados acuáticos, demostrando que gran proporción de estos son portadores de bacterias con actividades enzimáticas principalmente proteolíticas y lipolíticas mostrando un tamaño de halo de actividad mayor a 16 mm de diámetro (35). Cabe resaltar que al igual que esta investigación,

reportes de Pucci *et al.* (2009) y Sánchez *et al.* (2004) se logró aislar el género *Aeromonas sp* de ambientes acuáticos (37)(41), según Atlas y Bartha (2002) muchos géneros de bacterias presentes en el mar con el tiempo se han logrado adaptar a este medio adoptando características únicas, en este caso la *Aeromonas sp* es un microorganismo que vive a temperaturas de 20 a 37°C además que se puede desarrollar en presencia y ausencia de concentraciones sales (62).

CEPAS PROTEOLÍTICAS

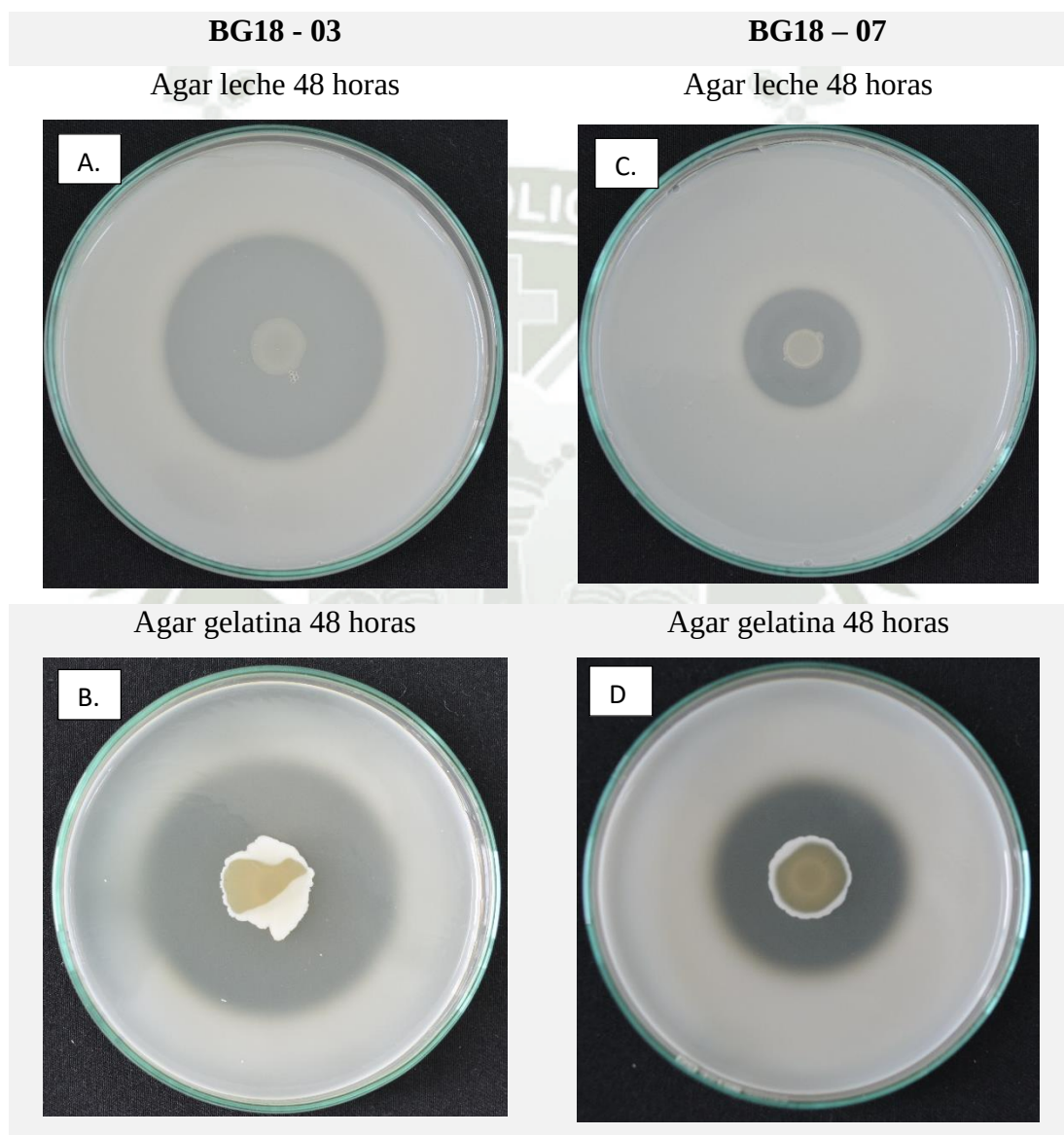


Figura N°12: A. Placa de cepa BG18-03 en medio Agar leche. B. Placa de cepa BG18-03 en medio Agar gelatina. C. Placa de cepa BG18-07 en medio Agar leche. D. Placa de cepa BG18-07 en medio Agar Gelatina.

Fuente: elaboración propia (2022).

CEPAS LIPOLÍTICAS

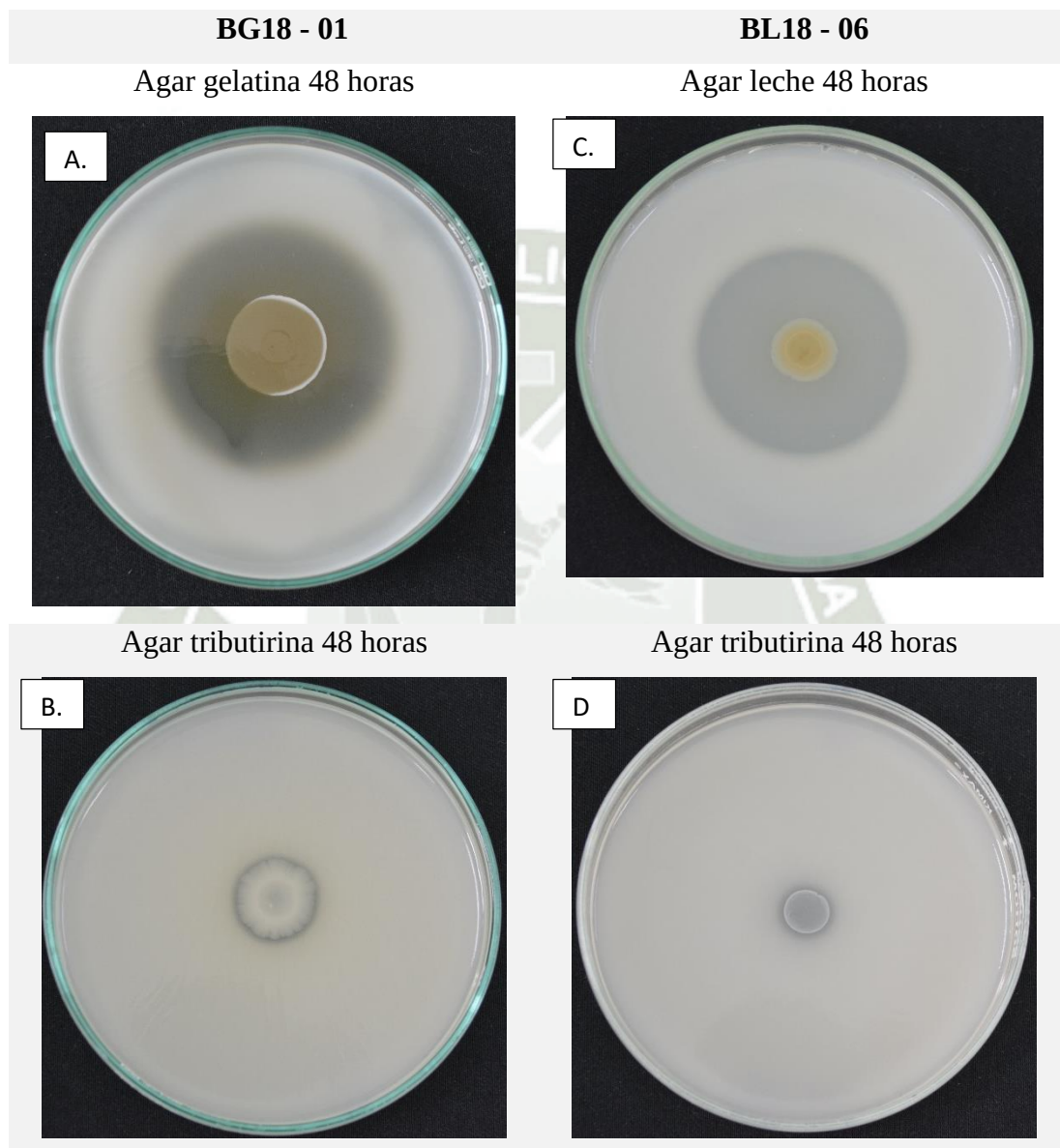


Figura N°13: A. Placa de cepa BG18-01 en medio Agar gelatina. B. Placa de cepa BG18.01 en medio Agar tributirina. C. Placa de cepa BL18-06 en medio Agar leche. D. Placa de cepa BL18-06 en medio Agar tributirina.

Fuente: elaboración propia (2022).

4.2.2. Pruebas de caracterización microbiana

Siendo uno de los objetivos encontrar aquellas bacterias con mejor capacidad de hidrólisis tanto para lípidos como para proteínas, se procedió a realizar la caracterización microbiana de las cepas BG18-01, BL18-06, BG18-03 y BG18-07.

4.2.2.1. Caracterización e identificación cepas bacterianas mediante pruebas de catalasa y oxidasa, tinción Gram y pruebas bioquímicas.

4.2.2.1.1. Determinación de Catalasa

A partir de cultivos jóvenes de las cepas BG18-01, BL18-06, BG18-03 y BG18-07, se tomó una colonia de cada cepa, se depositó en una placa Petri y se añadió una gota de H_2O_2 al 3%. Aquellas que no mostraron efervescencia fueron las cepas BG18-01, BG18-03 y BG18-07 resultando ser negativas para catalasa. Por lo contrario, la cepa BL18-06 mostró ser positiva (Tabla 9).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Sánchez et al. (2004) donde aislaron cepas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros y estas mostraron catalasa positiva para el género *Aeromonas sp*, tal como se obtuvo en este trabajo para la cepa BL18-06 (41). A pesar de ello y como se mencionó anteriormente el género *Aeromonas sp* es un género adaptable el cual en este estudio mostró ser también catalasa negativa como en el caso de la cepa BG18-03.

Tabla 9: Resultados de la prueba de Catalasa.

Cepa	Catalasa
BG18-01	-
BL18-06	+
BG18-03	-
BG18-07	-

Fuente: elaboración propia (2022).

4.2.2.1.2. Determinación de Oxidasa

Durante este ensayo se realizaron dos métodos uno utilizando una tira reactiva para oxidasa y otra con el reactivo N,N,N,N,-tetrametil-p-fenilendiamina. Se leyó para ambos métodos una reacción citocromo oxidasa positiva para las 4 cepas BG18-01, BL18-06, BG18-03 y BG18-07 cuando se observó la formación de un compuesto oxidado de color azul violeta (Tabla 10).

Resultados similares fueron reportados por Flores et al. (2010) donde las bacterias halotolerantes con actividad lipolítica que aislaron, mostraron una oxidasa positiva (61). Al igual que Sánchez et al. (2004) que mostraron que las bacterias del género *Aeromonas sp* eran oxidasa positiva (63).

Tabla N° 10: Resultados de la prueba de Oxidasa.

Cepa	Oxidasa
BG18-01	+
BL18-06	+
BG18-03	+
BG18-07	+

Fuente: elaboración propia (2022).

4.2.2.1.3. Caracterización microscópica por Tinción Gram

Uno de los métodos utilizados para la caracterización de las cepas aisladas fue la técnica de tinción Gram con la cual se determinó la morfología mediante inspección microscópica. Con el aumento 100X se observó que las 4 cepas (BG18-01, BG18-03, BG18-07 y BL18-06) mostraron un color rojo resultando ser células Gram negativo, con forma bacilar y extremos redondeados (ver Figura N°14).

Se observó diferencias entre las 4 cepas. De igual manera se vio una mejor adaptabilidad a temperatura de 35°C y rapidez en su formación. La cepa BL18-06 en la tinción Gram se diferenció de las otras tres por su color azul claro; mientras que las cepas BG18-01, BG18-03 y BG18-07 se tiñeron color azul oscuro, en ambos casos resultaron ser Gram positivo (Tabla 11). Resultados similares se encontraron en los reportes de Sánchez et al. (2004) donde las 5 cepas aisladas de ambientes marinos contaminados, mostraron ser bacilos Gram negativos (63). En este aspecto Flores et al. (2010) describieron que la mayoría de las bacterias ambientales

halotolerantes encontradas en su trabajo fueron bacilos Gram negativos con capacidad de producir enzimas (61).

La razón por la que, las bacterias Gram negativas se encuentran en mayor proporción en ambientes acuáticos según Pucci *et al.* (2009) se deben a la frecuencia de bacterias por estaciones relacionadas con la temperatura ambiente; estas tienen un mejor desarrollo durante la estación de primavera, debido a que el clima es más favorable siendo estas las más competentes en el medio marino con respecto a las Gram positivas (37).

Tinción Gram

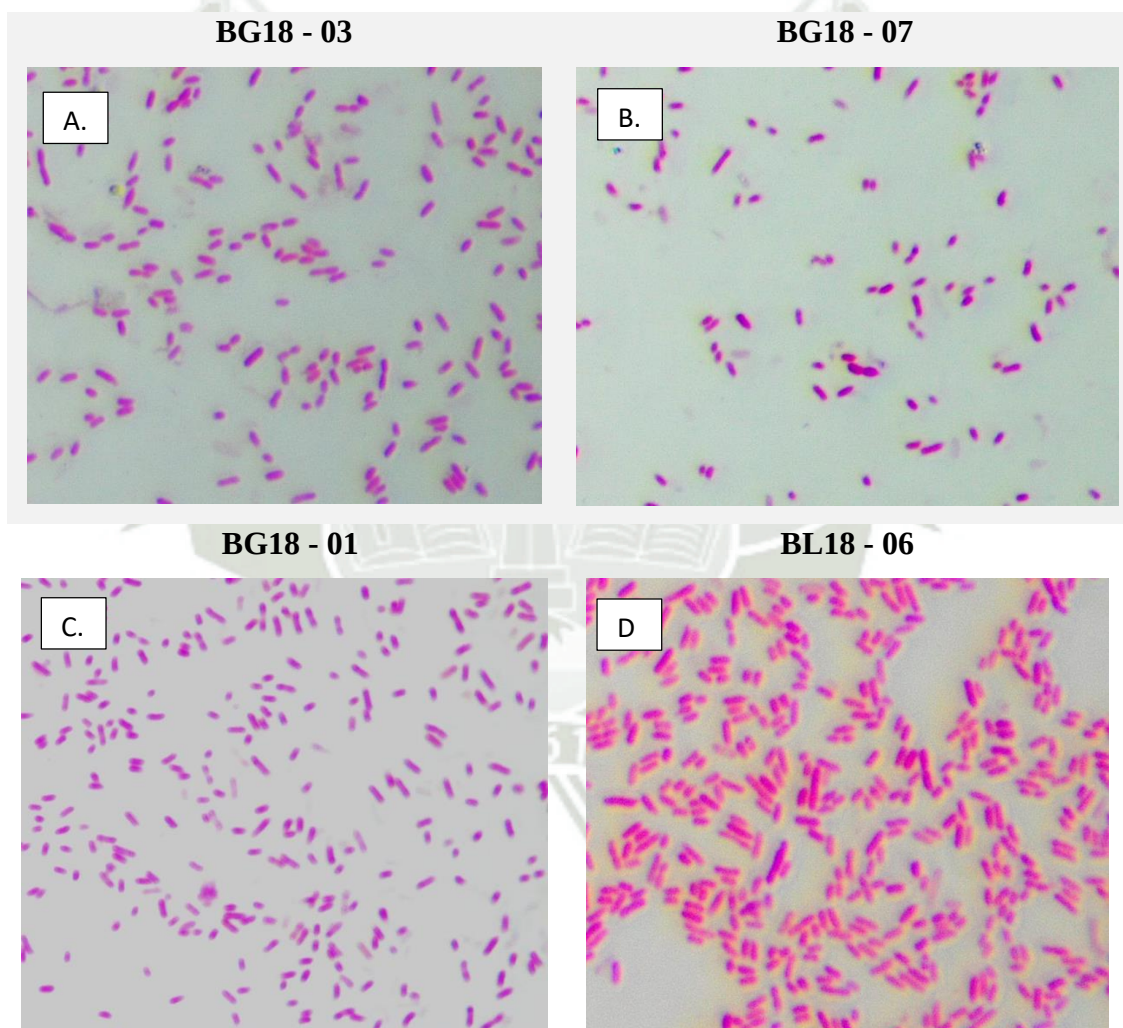


Figura N°14. Vista microscópica de las cepas aisladas del efluente agua de bombeo: A. Cepa BG18-03 Gram negativa, B. Cepa BG18-07 Gram negativa, C. Cepa BG18-01 Gram negativa y D. Cepa BL18-06 Gram negativa.

Fuente: elaboración propia (2022).

Tabla 11: Diferencias microscópicas de las cepas BG18-01, BG18-03 y BG18-07 y BL18-06.

Características	BG18-03	BG18-07	BG18-01	BL18-06
Medio de Cultivo	- TSA - Agar leche	- TSA - Agar leche	- TSA - Agar tributirina	- TSA - Agar tributirina
Crecimiento de Colonias	48 horas	48 horas	48 horas	24 horas
Color	Azul oscuro	Azul oscuro	Azul oscuro	Azul claro
Forma	Bacilo con borde redondeado	Bacilo con borde redondeado	Bacilo con borde redondeado	Bacilo empalizado con borde redondeado

Fuente: elaboración propia (2022).

4.2.2.1.4. Identificación bioquímica mediante el sistema API 20 NE

La lectura de cada galería de pruebas bioquímicas se realizó con relación a la Tabla de Identificación del kit, mediante la observación de los colores obtenidos en cada pocillo. Según esta interpretación se pudo establecer un resultado positivo (+) o negativo (-); luego a cada pocillo se le dio un valor numérico de 0, 1, 2 o 4 obteniendo al finalizar un perfil numérico de 7 cifras proveniente de la suma de los valores pertenecientes a las pruebas positivas (+). El perfil numérico obtenido para cada cepa después fue ingresado a la plataforma virtual APIWEB; obteniendo los siguientes resultados:

- **Cepa BG18-03:** El perfil numérico encontrado fue 7576755 que luego de haber sido ingresado a la plataforma de APIWEB, dio como resultado la identificación de la cepa como *Aeromonas hydrophila/caviae* con 83.9% de probabilidad, tal como se observa en la Figura N°15.

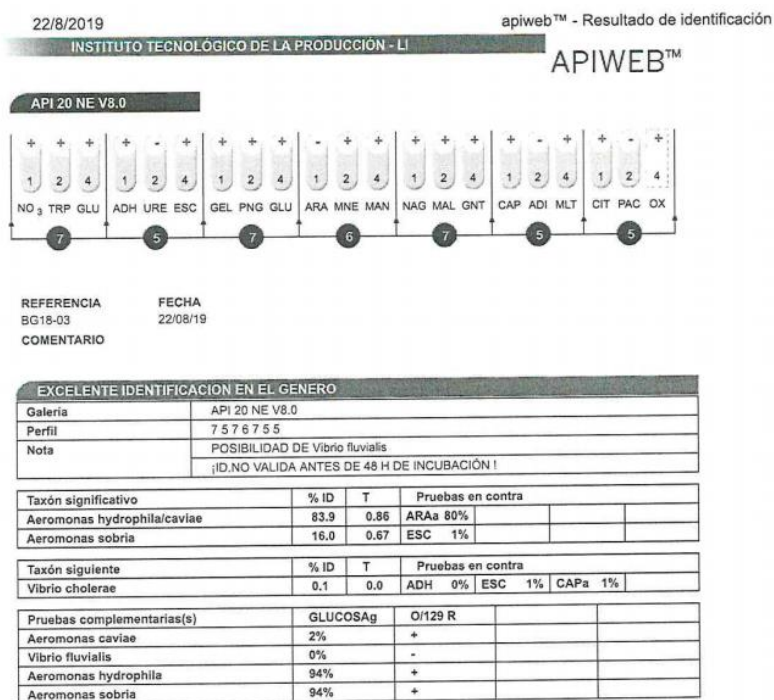


Figura N°15. Perfil de identificación bioquímica API 20 NE APIWEB TM de *Aeromonas hydrophila/caviae*.

Tomado de: <https://apiweb.biomerieux.com/login>

- **Cepa BG18-07:** El perfil numérico encontrado fue 7176755 que luego de haber sido ingresado a la plataforma de APIWEB, dio como resultado la identificación de la cepa como *Aeromonas sobria* con 99.2% de probabilidad, tal como se observa en la Figura N°16.

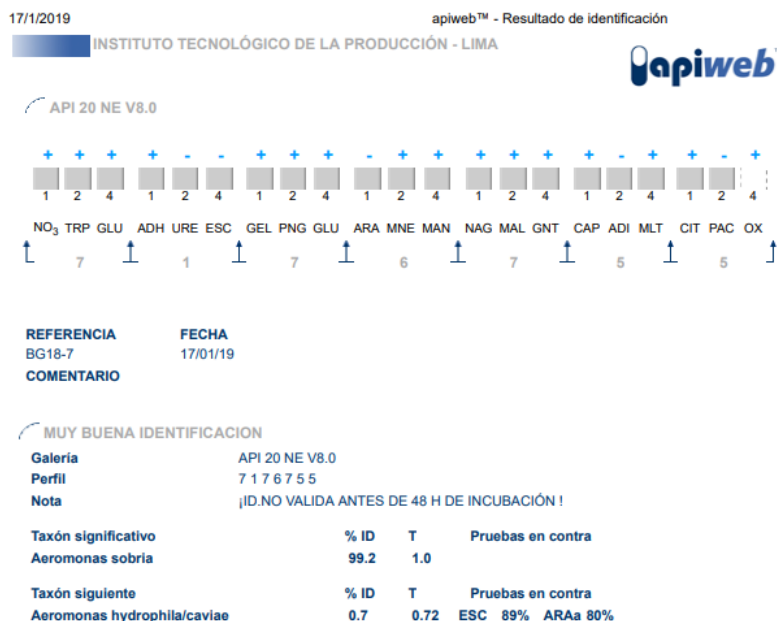


Figura N°16. Perfil de identificación bioquímica API 20 NE APIWEB TM de *Aeromonas sobria*.

Tomado de: <https://apiweb.biomerieux.com/login>

- **Cepa BG18-01:** El perfil numérico encontrado fue 7475755 que luego de haber sido ingresado a la plataforma de APIWEB, dio como resultado la identificación de la cepa como *Aeromonas hydrophila/caviae* con 99.9% de probabilidad un de probabilidad, tal como se observa en la Figura N°17.



Figura N°17. Perfil de identificación bioquímica API 20 NE APIWEB TM de *Aeromonas hydrophila/caviae*.

Tomado de: <https://apiweb.biomerieux.com/login>

- **Cepa BL18-06:** El perfil numérico encontrado fue 7777754 que luego de haber sido ingresado a la plataforma de APIWEB; dio como resultado la identificación de la cepa como *Aeromonas hydrophila/caviae* con 99.9% de probabilidad, tal como se observa en la Figura N°18.

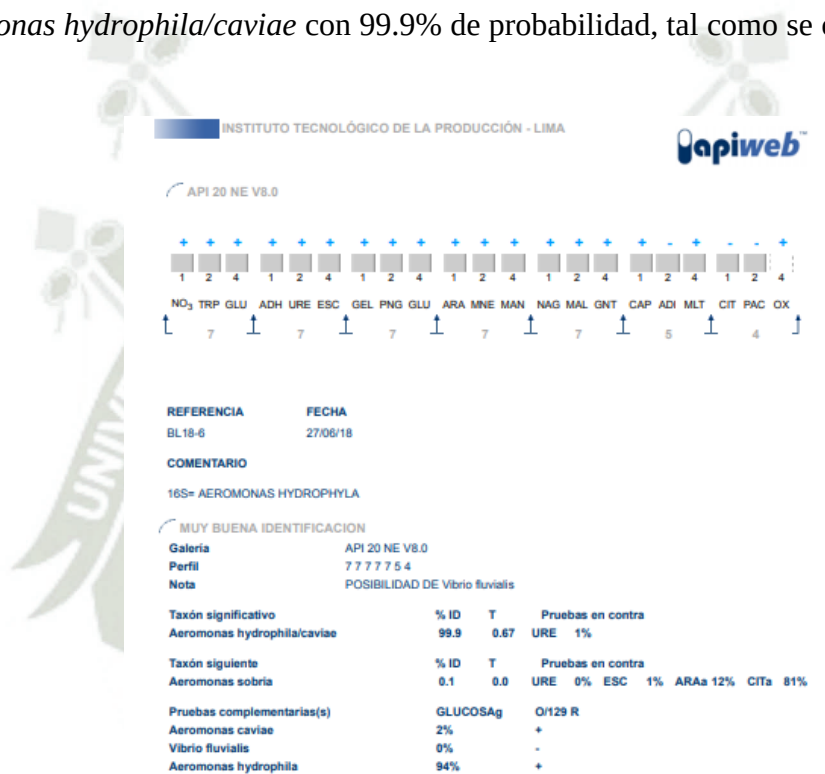


Figura N°18. Perfil de identificación bioquímica API 10 NE APIWEB TM de *Aeromonas hydrophila/caviae*.

Tomado de: <https://apiweb.biomerieux.com/login>

Los resultados encontrados en este trabajo, concuerdan con lo reportado por Sánchez *et al.* (2004) donde se aisló cepas de *Aeromonas sp.* en mayor proporción a comparación de otras cepas a partir de efluentes pesqueros (41). Al igual que autores como Pucci *et al.* pusieron en manifiesto que los géneros bacterianos identificados con mayor frecuencia en las costas suelen ser *Aeromonas sp.* y *Pseudomonas sp.* (37). Además, Castro *et al.* (2002), menciona que las bacterias del género *Aeromonas sp.* son especies mesófilas debido a que crecen a temperatura de 30 a 35°C (64).

Complementando estos resultados Bou *et al.* (2011) menciona que es difícil identificar bioquímicamente las subespecies de *Aeromonas sp.* (65).

4.3. Bioensayos de hidrólisis enzimática (Biorreacción)

Las cepas escogidas para los bioensayos de hidrólisis enzimática fueron seleccionadas por su capacidad en placa y su actividad enzimática. Si bien las cepas con mayor capacidad en placa fueron la cepa BG18-03 para proteólisis y la cepa BG18-01 para lipólisis, se seleccionó la cepa BL18-06 usando aceite de oliva como inductor de producción de lipasas mostrando tener mayor actividad lipolítica frente a la cepa BG18-01 a las 8, 24 y 48 horas de cultivo (Tabla 12).

Tabla 12. Evaluación de la actividad lipolítica inducida en aceite de oliva.

Actividad enzimática (U/mL)			
Cepas	8 horas	24 horas	48 horas
BL18-06	1.51	1.34	1.48
BG18-01	1.03	1.02	0.94

Fuente: elaboración propia (2022).

Los resultados para actividad lipolítica fueron obtenidos por el método cuantitativo de hidrólisis de p-nitrofenol palmitato que fue realizado por Gupta *et al.* (2003) (66) y Jaegaer y Kovacic (2014) (67).

Para el caso de la actividad proteolítica los resultados fueron obtenidos por el método de hidrólisis de azocaseína descrito por García y Haard (1993) donde mostro tener mayor capacidad proteolítica la cepa BG18-03 de 0.76 U/g, 0.81 U/g y 0.80 U/g durante los tiempos 8,24 y 48 horas respectivamente (Tabla 13). La unidad de actividad fue el cambio de absorbancia (440nm) por minuto por g de proteína enzimática (68).

Tabla 13. Evaluación de la actividad proteolítica de la cepa BG18-03

Actividad enzimática (U/g)			
Cepa	8 horas	24 horas	48 horas
BG18-03	0.76	0.81	0.80

Fuente: elaboración propia (2022).

Entonces a partir de esta etapa se trabajó con la cepa BG18-03 como la más proteolítica y BL18-06 como la cepa más lipolítica (Tabla 14) tal como se ve en la Figura N° 19 en el Anexo 1. Estas cepas aisladas del efluente agua de bombeo mostraron un crecimiento óptimo a 10^8 UFC/mL a temperatura 35°C durante 24 horas (Figura N°20).

Tabla 14. Cepas bacterianas seleccionas según su capacidad enzimática.

Lista de Cepas bacterianas en estudio	
Cepa microbiana con mejor capacidad proteolítica	BG18-03
Cepa microbiana con mejor capacidad lipolítica	BL18-06

Fuente: elaboración propia (2022).

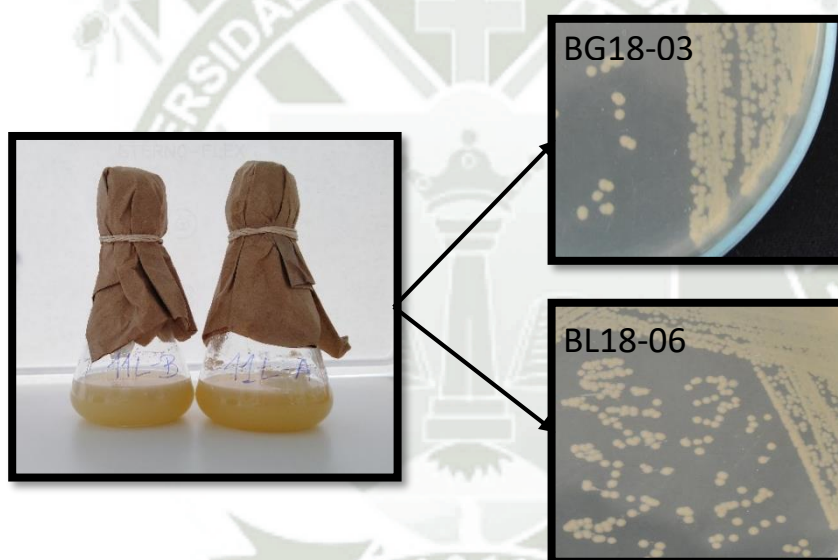


Figura N° 20. Cultivo de cepas BG18-03 y BL18-06 en medio líquido TSB y medio sólido TSA

Fuente: elaboración propia (2022).

Por otro lado, el sustrato utilizado para hidrólisis enzimática de lípidos tras los tratamientos descritos anteriormente, resultó un sustrato rico en grasas de cadenas largas, pero en su mayoría cortas para una fácil asimilación de las cepas. Según Alexandre *et. al.*(2011) estos efluentes están conformados por proteínas y lípidos, conteniendo 1500 mg/L de aceites y grasas (24). Mientras que para el sustrato de hidrólisis proteolítica el efluente no tuvo modificaciones debido a su alto contenido de solidos suspendidos; que al momento de ser expuesto a altas temperaturas

se producía la desnaturalización de los compuestos orgánicos siendo contraproducentes para el objetivo de la investigación.

Después de los bioprocesos de desproteinización y deslipidificación, todas las muestras resultantes fueron analizadas para determinar el contenido final de humedad (%H), grasa cruda (%G) y proteína (%P) por los métodos ya descritos.

4.4. Caracterización de los productos hidrolizados

Durante el proceso de desproteinización, las muestras obtenidas de los bioprocesos, fueron esterilizadas por calor húmedo en el autoclave. Estas fueron almacenadas en tubos cónicos de 50 ml previamente rotulados (Figura N°21). Se observó que la muestra tratada con la cepa BG18-03; formó flóculos de materia orgánica que, al momento de estar en reposo, estos se iban al fondo y quedaba otra fase sobrenadante constituida por un líquido clarificado a diferencia del sustrato inicial. Se obtuvieron los mismos resultados para la muestra tratada con la enzima PROTAMEX. Haciendo énfasis en estos resultados se observó que esta cepa bacteriana es capaz de reducir compuestos proteicos presentes en el AB, teniendo una capacidad de clarificación similar a la de una enzima PROTAMEX. Las muestras de los controles fueron diferentes al no observarse la formación de dos fases y cambios en su color inicial (Tabla 15).



**Figura N°21. Muestras solubles obtenidas en los bioprocesos de hidrólisis
enzimática de materia orgánica**

Fuente: elaboración propia (2022).

Resultados similares a este trabajo reportaron Pizarro *et al.* (2001) en estudios utilizando métodos de flotación, usando fluctuantes orgánicos e inorgánicos, logrando la separación rápida de fases líquidas y sólidas, sin embargo, estos tratamientos a diferencia del propuesto dejan contaminantes en el objeto en estudio (10). Más adelante en el 2014, este mismo autor propone utilizar microorganismos como el *Lactobacillus* logrando una clara separación del material sólido de la fase acuosa del agua de bombeo dejándola más clarificada (69).

Tabla N°15. Caracterización física de las muestras de desproteinización.

Características físicas de las muestras de desproteinización		
Muestras	Clarificación	Formación de flóculos
Con cepa BG18-03	+++	+++
Con enzima PROTAMEX	+++	+++
Control	-	-

Donde:

Clarificación	Buena	+++
	Media	++
	Mala	-
Formación de flóculos	Alta	+++
	Media	++
	Baja	-

Fuente: elaboración propia (2022).

Mientras que durante el proceso de deslipidificación las muestras obtenidas de los bioprocesos; se esterilizaron por calor húmedo. Luego fueron almacenadas en tubos cónicos de 50 ml previamente rotulados (Figura N° 22). Se observó a primera vista que la muestra con tratamiento con la cepa BL18-06 logró clarificar el sustrato; además mostró una oleaginosidad baja al agitar el tubo. Observándose lo mismo en la muestra tratada con la enzima BUZYME 7707. Mientras que para las muestras de los controles fue diferente; para el Control + su clarificación medio y su oleaginosidad media y para el Control – su clarificación fue baja y oleaginosidad alta (Tabla 16). Se puede deducir que la cepa BL18-06 es capaz de reducir grasas y aceites presentes en el AB; teniendo una capacidad de hidrólisis lipolítica similar a una enzima comercial.

Con respecto a un pretratamiento del efluente contaminado Marín *et al.* (2015) propone al igual que este trabajo realizar un pretratamiento para reducir el contenido de materia orgánica para aumentar la eficiencia de los bioprocesos (19).



**Figura N°22. Muestras solubles obtenidas en los bioprocesos de hidrólisis
enzimática de contenido orgánico**

Fuente: elaboración propia (2022).

Tabla N° 16. Caracterización física de las muestras de deslipidificación.

	Características físicas de las muestras de deslipidificación	
Muestras	Clarificación	Oleaginosidad
Con cepa BL18-06	+++	-
Con enzima BUZYME 7707	+++	-
Control +	++	++
Control -	-	+++

Donde:

Clarificación	Buena	+++
	Media	++
	Mala	-
Oleaginosidad	Alta	+++
	Media	++
	Baja	-

Fuente: elaboración propia (2022).

4.5. Análisis estadístico de los bioprocesos de hidrólisis empleando las cepas BG18-03 y BL18-06

4.5.1. Análisis del proceso de hidrólisis empleando la cepa BG18-03

4.5.1.1. Análisis comparativo de los bioensayos de desproteinización con respecto de los controles

La reducción de la materia orgánica (%DBO₅) del efluente AB, para las muestras de los bioensayos con la cepa BG18-03, ensayos con la enzima comercial PROTAMEX y Controles; fueron analizadas mediante un ANOVA de una sola vía y un análisis comparativo de Tukey Kramer.

Los resultados que se observaron en el ANOVA de una sola vía, mostraron que existía una diferencia significativa entre los bioensayos y sus controles experimentales; donde el valor de probabilidad fue de 0.00 menor al valor de significancia elegido de 0.05 tal como se observa en la (Anexo 3, tabla 17).

Para comprobar que los resultados del ANOVA son fiables, se realizó la validación de los supuestos de normalidad, igualdad de varianzas e independencia de los errores con respecto a los residuos. Obteniéndose lo siguiente:

Se cumplió el supuesto de normalidad porque los datos siguieron una distribución normal donde el valor de Anderson-Darling fue de 0.644 mayor a 0.05, también se cumplió el supuesto para la independencia de los errores, donde se vio que los residuos no seguían un patrón definido. Sin embargo, no se cumplió el supuesto de igualdad de varianzas ya que los residuos no seguían un patrón definido donde el valor de la prueba de Bartlett fue de 0.038 menor a 0.05; en concordancia con lo reportado por Gutiérrez y De la Vara (2008)(52), si uno de los supuestos no se cumple esto no afecta en el análisis.

Los datos se ajustaban a los valores esperados por el modelo teniendo una desviación estándar de las muestras pequeñas (Tabla 18); con diferencia del bioensayo (B5 y B8), Control (B5, B6 y B7) y el Control enzima PROTAMEX B7 (Anexo 3, tabla 18).

El análisis de Tukey Kramer sobre la reducción de la materia orgánica (%DBO₅) con la cepa BG18-03 con respecto de sus controles determinó que el Control (B8 y B6) y los bioensayos (B6 y B8) son significativamente iguales entre sí; siendo estos los mejores valores de la reducción de materia orgánica (%DBO₅) con valores superiores al 65% (Tabla 24) y una reducción de la DBO₅ menores a 2900 mg/L tal como se observa en la Tabla 24, indicando que el comportamiento de la cepa BG18-03 fue buena para la reducción de la DBO₅ siendo una alternativa para estudios de aplicación en plantas de tratamiento biológicas de los efluentes pesqueros. Seguido de los Controles de enzima PROTAMEX (B5, B6 y B8) y los bioensayos (B5 y B8) que fueron significativamente iguales entre sí (Tabla 19), a pesar que los valores obtenidos no fueron los mejores se pudo observar que la enzima PROTAMEX de alguna forma tubo la capacidad de reducir el porcentaje de la DBO₅ hasta el 65% con valores inferiores a 3500 mg/L. Mientras que el Control enzima PROTAMEX B7 fue aquel ensayo que mostro el valor más bajo en la reducción de la materia orgánica (%DBO₅) con valores de 30% tal como se observa en la Tabla 24.

Tabla N° 19. Análisis comparativo de Tukey Kramer sobre la reducción de la materia orgánica (%DBO₅) del efluente AB, con la cepa BG18-03.

Ensayos	Número de réplicas	Media	Agrupación						
Control B8	2	76.6909	A						
B6	2	74.5528	A						
Control B6	2	70.68	A	B					
B8	2	69.117	A	B	C				
PROTAMEX B6	2	65.414		B	C	D			
PROTAMEX B8	2	64.617		B	C	D			
PROTAMEX B5	2	61.571			C	D	E		
B5	2	61.43			C	D	E		
Control B7	2	59.28				D	E		
B7	2	54.5416					E	F	
Control B5	2	50.03						F	
PROTAMEX B7	2	33.75							G

Fuente: elaboración propia (2022).

El porcentaje de desproteinización (%DP) del efluente AB, para las muestras tratadas con la cepa BG18-03, enzima comercial PROTAMEX y Controles; fueron analizadas mediante ANOVA de una sola vía y un análisis comparativo de Tukey Kramer.

Los resultados observados en el ANOVA de una sola vía; mostraron que existía una diferencia significativa entre los bioensayos y sus controles experimentales; siendo el valor de probabilidad (valor p) 0.00 menor al valor de significancia escogido de 0.05 (Anexo 4, tabla 20).

Se cumplió el supuesto de normalidad porque los datos siguieron una distribución normal donde el valor de Anderson-Darling fue de 0.347 mayor a 0.05, en el caso de la igualdad de varianzas

también se cumplió usando la prueba de Bartlett donde el valor probabilidad fue de 0.720 mayor a 0.05 y para la independencia de los errores, mostró que los residuos no seguían un patrón definido, aceptándose este supuesto. Los datos se ajustaban a los valores esperados por el modelo siendo la desviación estándar de las muestras pequeñas (Anexo 4, tabla 21).

El análisis de Tukey Kramer sobre el porcentaje de desproteínización (%DP) con la cepa BG18-03 con respecto de sus controles determino que todos los bioensayos en estudio son significativamente diferentes a los controles con enzima y controles +. Además, se vio que los bioensayos B8 y B6 fueron los mejores y son significativamente diferentes a las enzimas, controles + y diferentes entre sí (Tabla 22) siendo estos los bioensayos con los mejores resultados al reducir el contenido proteico de 35.43% a 2% y 5% respectivamente (Tabla 24).

El bioensayo B7 no obtuvo los mejores resultados, pero se observó que fue significativamente diferente a los bioensayos, controles y control enzima tal como se aprecia en la tabla 22; logrando reducir hasta un 21% la cantidad de proteínas. Deduciéndose que las condiciones de operación en los bioensayos B6 y B8 son los mejores.

El control B7 es significativamente igual al control B8 y PROTAMEX B5, posiblemente debido a que la enzima trabajo fuera de su rango óptimo.

Por otro lado, el bioensayo B5 es diferente a los controles, sin embargo, no es la más significativa porque es menor a los resultados obtenidos con la PROTAMEX B7, pudiendo decir que la cantidad de enzima producida a estas condiciones no es superior al mejor ensayo con la enzima comercial PROTAMEX.

Los ensayos PROTAMEX B8 y B6 son significativamente diferentes a los demás bioensayos, controles y enzimas (Tabla 22) logrando remover hasta 19% y 22% de contenido proteico respectivamente (Tabla 24).

Tabla 22. Análisis comparativo de Tukey Kramer sobre el %DP del efluente AB, con la cepa BG18-03.

Bioensayos	Número de réplicas	Media	Agrupación							
B8	2	93.1243	A							
B6	2	85.469		B						
PROTAMEX B8	2	44.5891			C					
B7	2	40.125				D				
PROTAMEX B6	2	37.168					E			
PROTAMEX B5	2	25.73						F		
Control B7	2	25.493						F		
Control B8	2	24.586						F		
PROTAMEX B7	2	22.9931							G	
B5	2	22.007							G	
Control B6	2	14.342								H
Control B5	2	14.248								H

Fuente: elaboración propia (2022).

La comparación de los bioensayos y sus controles sobre la respuesta %DL fueron analizadas observándose que los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia de los errores no se cumplían, por lo cual fueron analizados mediante la prueba paramétrica de la mediana de Mood.

Con ello se determinó que todos los bioensayos con respecto de sus controles eran significativamente diferentes entre sí; obteniendo un valor de p 0.045 menor a 0.05 (Anexo 5, tabla 23) rechazándose la hipótesis nula.

Tabla 24. Cuadro con los datos de contenido inicial y final de grasa y proteína del sustrato M1, los porcentajes de deslipidificación y desproteinización (%DL y % DP) y valores de DBO_5 posteriores a los bioensayos de hidrólisis, así como los porcentajes de DBO_5 reducidos con la cepa BG18-03.

Ensayo	Parámetros					
	DBO ₅	%DBO ₅	%Grasa	%DL	%Proteína	%DP
M1	8945	-	29.19	-	35.43	-
B5(a)	3742.5	58.16	6.10	79.08	27.71	21.77
B5(b)	3157.5	64.70	6.98	76.09	27.55	22.24
B6(a)	2282.5	74.48	2.82	90.33	5.18	85.37
B6(b)	2270	74.62	2.79	90.42	5.11	85.57
B7(a)	4075	54.44	4.46	84.74	21.29	39.91
B7(b)	4057.5	54.64	4.48	84.65	21.14	40.34
B8(a)	2677.5	70.07	1.06	96.37	2.42	93.16
B8(b)	2847.5	68.17	1.26	95.69	2.45	93.08
Control B5(a)	4605	48.52	6.32	78.35	30.32	14.44
Control B5(b)	4335	51.54	6.46	77.87	30.45	14.06
Control B6(a)	2870	67.92	6.58	77.46	30.40	14.19
Control B6(b)	2375	73.45	6.39	78.09	30.30	14.49
Control B7(a)	3827.5	57.21	5.65	80.64	26.31	25.74
Control B7(b)	3457.5	61.35	5.02	82.82	25.49	25.25
Control B8(a)	2090	76.63	5.47	81.27	26.81	24.33
Control B8(b)	2080	76.75	5.56	80.95	26.63	24.85
PROTAMEX B5(a)	3420	61.77	28.79	1.38	26.39	25.53
PROTAMEX B5(b)	3455	61.38	28.95	0.84	26.25	25.93
PROTAMEX B6(a)	3110	65.24	28.65	1.89	22.12	37.57
PROTAMEX B6(b)	3077.5	65.60	28.85	1.21	22.41	36.76
PROTAMEX B7(a)	6125	31.53	28.27	3.19	27.30	22.96
PROTAMEX B7(b)	5727.5	35.97	28.26	3.22	27.28	23.02
PROTAMEX B8(a)	3192.5	64.31	28.23	3.32	19.65	44.56
PROTAMEX B8(b)	3137.5	64.92	28.30	3.08	19.62	44.62

Fuente: elaboración propia (2022).

4.5.1.2. Análisis del diseño factorial 2^2 del bioproceso de desproteínización, deslipidificación y DBO_5 con la cepa BG18-03.

Para el análisis de los resultados de la reducción del porcentaje de la DBO_5 ; se realizó un diseño factorial 2^2 , análisis de varianza tipo factorial y una regresión lineal múltiple ya que se utilizó dos predictores (temperatura y tiempo). Según la Tabla 25 (Anexo 6) el efecto de interacción doble Temperatura*Tiempo (AB) fue el más importante sobre el bioproceso, seguido del efecto individual Tiempo (B). El modelo mostro un valor p de 0.004 menor a 0.05 indicando que el modelo es capaz de predecir y explicar la reducción en la materia orgánica (% DBO_5) empleando la cepa BG18-03.

También se realizó la validación de los supuestos de normalidad, igualdad de varianzas e independencia de los errores. Además, se realizó una ecuación de predicción del análisis de regresión lineal múltiple. En la normalidad; los residuos siguieron una distribución normal con un factor de Anderson-Darling de 0.503 y un valor p de 0.141 mayor a 0.05. De igual manera se cumplió el supuesto de independencia de los errores sobre los residuos del % DBO_5 . Sin embargo, no se cumplió el supuesto de igualdad de varianzas ya que los residuos no seguían un patrón definido dando un valor de probabilidad de Bartlett 0.038 menor a 0.05, pero en concordancia con lo reportado por Gutiérrez y De la Vara (2008) esto no afecta en el análisis si uno de los supuestos no se cumple ya que en sistemas o diseños de experimentos robustos como es el diseño factorial se puede incumplir uno de los supuestos sin que se pierda validez de las afirmaciones obtenidas del ANOVA y de la regresión lineal.

El factor de inflación de varianza (FIV) fue de 1 para todos los efectos (Anexo 6, Tabla 25), deduciendo que los factores son independientes y no existe colinealidad entre ellos.

En el análisis de varianza y de regresión lineal múltiple se observó un coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}) de 91.60 (Anexo 6, Tabla 25), indicando que el modelo se ajusta bien a los datos y que explica el 91.60 de la reducción de la materia orgánica (% DBO_5) por acción de la cepa BG18-03.

Por último, mediante análisis de regresión lineal múltiple se obtuvo la siguiente ecuación de predicción:

$$\% \text{DBO}_5 = 65.02 - 0.508 \text{ Temperatura } (^\circ\text{C}) + 0.699 \text{ Tiempo (h)} + 0.0061 \text{ Temperatura } (^\circ\text{C}) * \text{Tiempo (h)}$$

A partir de esta ecuación de predicción con la cepa BG18-03 se obtuvo las mejores condiciones de operación que fueron a 20°C durante 24 horas.

Luego para el análisis del %DP, también se realizó un diseño factorial 2², un análisis de varianza tipo factorial y una regresión lineal múltiple ya que se utilizó dos predictores para ver que variable individual y de interacción (temperatura y tiempo) tuvo mayor influencia sobre el %DP. Se vio que los efectos individuales y de interacción doble fueron significativos para explicar el bioproceso en estudio (Anexo 7, tabla 26) dado el valor p es 0.000 menor a 0.05. Según la Tabla 26 (Anexo 7) el efecto más importante sobre el bioproceso fue el efecto de interacción doble Temperatura*Tiempo (AB), seguido del efecto individual Tiempo (B). El modelo mostro un valor p de 0.000 menor a 0.05 indicando que el modelo es capaz de predecir y explicar la reducción de proteínas empleando la cepa BG18-03.

Se hizo la validación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los errores. También se generó una ecuación de predicción con el análisis de regresión lineal múltiple. En el caso de la normalidad los residuos seguían una distribución normal, ya que mostró un factor de Anderson-Darling de 0.203 y un valor p de 0.811 mayor a 0.05. Se cumplió el supuesto de homocedasticidad, ya que los residuos no seguían un patrón definido dando un valor de probabilidad de Bartlett de 0.551 mayor a 0.05. En el caso de la independencia de los errores también se cumplió el supuesto ya que estos no seguían un patrón definido. El factor de inflación de varianza (FIV) fue de 1 para todos los efectos, deduciendo que los factores son independientes y no existe colinealidad entre ellos.

Para el análisis de varianza y de regresión lineal múltiple se observó un coeficiente de determinación ajustado (R² aj) de 99.99 (Tabla 26), que indicó que el modelo se ajusta a los datos y que el modelo es capaz de explicar el 99.99 de la reducción proteínas por acción de la cepa BG18-03.

Por último, mediante análisis de regresión lineal múltiple se obtuvo la siguiente ecuación de predicción:

$$\%DP = -40.856 + 1.5566 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) + 4.8382 \text{ Tiempo (h)} - 0.04359 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Tiempo (h)}$$

A partir de esta ecuación de predicción con la cepa BG18-03 las mejores condiciones de operación de temperatura y tiempo para el bioproceso de desproteínización (%DP) fueron a 35°C durante 24 horas.

Los resultados de deslipidificación (%DL) mostró que el efecto más importante sobre el bioproceso fue el de interacción doble Temperatura*Tiempo (AB), seguido por el efecto individual Tiempo (B) (Anexo 8, tabla 27). El modelo. El modelo mostró un valor p de 0.000 menor a 0.05 indicando que el modelo es capaz de predecir y explicar la reducción de grasas por acción de la cepa BG18-03.

Se cumplió con el supuesto de normalidad con un factor de Anderson-Darling de 0.604 y un valor p de 0.075 mayor a 0.05. Asimismo, se cumplió el supuesto de independencia de los errores sobre los residuos del %DL. Sin embargo, no se cumplió el supuesto de homocedasticidad ya que los residuos no seguían un patrón definido dando un valor de probabilidad de Bartlett de 0.039 menor a 0.05; según lo reportado por Gutiérrez y De la Vara (2008), no afecta en el análisis si uno de los supuestos no se cumple. El factor de inflación de varianza (FIV) fue de 1 para todos los efectos (Anexo 8, tabla 27).

El análisis de varianza y de regresión lineal múltiple mostró un coeficiente de determinación ajustado (R^2 aj) de 97.82 (Anexo 8, tabla 27), indicando que el modelo se ajusta a los datos y logra explicar que el 97.82 de la reducción de grasas se debe al tratamiento con la cepa BG18-03. El análisis de regresión lineal múltiple generó la siguiente ecuación de predicción:

$$\%DL = 60.73 + 0.523 \text{ Temperatura } (^{\circ}C) + 0.921 \text{ Tiempo (h)} - 0.00607 \text{ Temperatura } (^{\circ}C) * \text{Tiempo (h)}$$

A partir de esta ecuación de predicción con la cepa BG18-03, las mejores condiciones de operación para el bioproceso de deslipidificación (%DL) fueron 35°C y 24 horas.

Por lo tanto, las mejores condiciones de temperatura y tiempo del bioproceso con la cepa BG18-03 que permitieron la mayor deslipidificación, desproteinización y reducción de la DBO₅, fueron las siguientes:

- 35°C en 24 horas, para lograr 93.12 y 96.03 % de DP y DL respectivamente.
- 20°C en 24 horas, para lograr 74.55% de reducción de la DBO₅.

4.5.2. Análisis del proceso de hidrólisis empleando la cepa BL18-06

4.5.2.1. Análisis comparativo de los bioensayos de deslipidificación con respecto de los controles

Los resultados de la reducción de la materia orgánica (%DBO₅) del efluente AB, de las muestras de los bioensayos con la cepa BL18-06, Controles enzima BUZYME 7707, controles positivos

y controles negativos, fueron analizados mediante un ANOVA de una sola vía y un análisis comparativo de Tukey Kramer.

Los resultados observados en el ANOVA de una sola vía, mostraron que existía una diferencia significativa entre los bioensayos y sus controles experimentales ($p < 0.05$) (Anexo 9, tabla 28).

Se cumplió el supuesto de normalidad con un valor de Anderson-Darling de 0.081, con un valor p de 0.999 mayor a 0.05. También se cumplió el supuesto de homocedasticidad con la prueba de Bartlett con un valor de probabilidad de 0.690 mayor a 0.05. Asimismo, se cumplió con el supuesto de independencia de los errores.

Los datos se ajustaban a los valores esperados por el modelo teniendo una desviación estándar de las muestras pequeñas; con diferencia del bioensayo (B2, B3 y B4), Control enzima BUZYME (B1, B2, B3 y B4) y Controles – (B1, B2 y B3) tal como se observa en la Tabla 29 (Anexo 10).

El análisis de Tukey Kramer sobre la reducción de la materia orgánica (%DBO₅ reducido) con la cepa BL18-06 con respecto de sus controles determinó, que el bioensayo B4 es significativamente diferente a todos los controles positivos, controles negativos y controles enzima, este obtuvo el mejor resultado para la reducción de materia orgánica (%DBO₅ reducido) con valores superiores al 50% y una reducción de la DBO₅ menor a 3700 mg/L tal como se observa en la Tabla 37, indicando que el comportamiento de la cepa BL18-06 fue la mejor entre todos los ensayos de deslipidificación para la reducción del %DBO₅, a diferencia de la cepa BG18-03 que obtuvo mejores valores de reducción de materia orgánica (%DBO₅ reducido) y esto se debió a que la cepa BL18-06 fue altamente capaz de descomponer grasa más no degradar materia orgánica.

Los bioensayos B1 y B2 fueron significativamente iguales a los Controles negativos B2 y B4 (Tabla 30), estos mostraron valores cercanos entre si deduciéndose que el comportamiento de la cepa BL18-06 a 20°C es similar a los controles negativos y esto pudo deberse a que la cepa no tiene la capacidad de reducir la materia orgánica (%DBO₅) al igual que el control negativo que solo contenía el sustrato M7 estéril. Sucedió lo mismo para el bioensayo B1 y B3 que fueron significativamente iguales al Control - B2.

También se observó que todos los controles de enzima BUZYME B1, B2, B3 y B4 fueron similares entre si demostrando, ya que se comportaron de igual forma durante todas las temperaturas y tiempos estudiados sobre el proceso tal como se observa en la Tabla 30,

mostrando valores bajos de reducción de materia orgánica (%DBO₅), debido a que esta enzima comercial es buena degradando grasas.

Los controles positivos B1 y B2 fueron los ensayos que mostraron los porcentajes más bajos de reducción de materia orgánica (%DBO₅) entre 15 y 9%, esto pudo deberse a que el sustrato M7 después del tratamiento físico no contenía muchos sólidos en suspensión y los microorganismos del medio no lograron reducir la materia orgánica (%DBO₅) a 20°C.

Tabla 30. Análisis comparativo de Tukey Kramer sobre la reducción de la materia orgánica (%DBO₅) del efluente AB, con la cepa BL18-06.

Ensayos	Número de réplicas	Media	Agrupación							
B4	2	58.23	A							
B2	2	44.57		B						
Control -B4	2	43.915		B						
B1	2	40.827		B	C					
Control -B2	2	38.374		B	C					
B3	2	35.83			C	D				
Control -B3	2	29.87				D	E			
Control +B4	2	28.323					E	F		
Control +B3	2	24.447					E	F		
Control -B1	2	23.84					E	F		
BUZYME B2	2	21.995						F	G	
BUZYME B3	2	17.44							G	H
BUZYME B1	2	17.121							G	H
BUZYME B4	2	16.818							G	H
Control +B2	2	14.896								H
Control +B1	2	9.809								I

Fuente: elaboración propia (2022).

Luego los resultados del porcentaje de deslipidificación (%DL) de las muestras tratadas con la cepa BL18-06, enzima comercial BUZYME 7707, Controles positivos y Controles negativos fueron analizados mediante un ANOVA de una sola vía y un análisis comparativo de Tukey Kramer.

Los resultados observados en el ANOVA de una sola vía; mostraron que existía una diferencia significativa entre los bioensayos y sus controles experimentales ($p < 0.05$) (Anexo 11, tabla 31).

Los datos seguían una distribución normal aproximándose a la línea de tendencia, con un valor de Anderson-Darling de 0.063 siendo mayor a 0.05. El supuesto de igualdad de varianzas mostró que las varianzas obtenidas del %DL no eran iguales por lo cual se cumple el supuesto, además el valor de probabilidad de Bartlett fue de 0.537 mayor a 0.05. Por último, la independencia de los errores mostró que los residuos no seguían un patrón definido, aceptándose este supuesto.

El análisis comparativo de Tukey Kramer del %DL con respecto a la cepa BL18-06; mostro que los datos se ajustaban a los valores esperados por el modelo teniendo una desviación estándar pequeña con diferencia del bioensayo B4, Control -B1, Control +B2 y Control +B3 (Anexo 12, tabla 32).

El análisis de Tukey Kramer sobre el porcentaje de deslipidificación (%DL) con la cepa BL18-06 con respecto a sus controles, permitió determinar que los resultados del bioensayo B4 fueron similares a los resultados obtenidos en el ensayo con la enzima comercial BUZYME B2 y BUZYME B4 (Tabla 33), evidenciando que la cepa BL18-06 es capaz de reducir el contenido de grasa respecto al control con la enzima comercial. El contenido de grasa en los bioensayos se redujo de 24.28% a 1.4% es decir una deslipidificación de 93.94% y 92.11% para los bioensayos B4(a) y B4(b) respectivamente (Tabla 37). Los controles con enzima BUZYME B2 y BUZYME B4 redujeron el contenido de grasa a 1.16% y 1.72% respectivamente es decir una deslipidificación de 95% y 93%. Los mejores resultados para deslipidificación de M7 fueron observados en el bioensayo B4 con la cepa BL18-06 que se comportó de forma similar que con la enzima comercial BUZYME 7707.

Los resultados de los bioensayos B4 y B3 fueron similares a los resultados de los controles BUZYME B1 y B4 (Tabla 24) el mejor resultado con la enzima fue observado a 20°C y con la cepa a 35°C.

Luego se observó un patrón para los resultados de los bioensayos B2 y B3 con respecto al control +B4 y el control de enzima BUZYME B1 y B3; mostrando que fueron similares entre sí a pesar de no ser los mejores resultados para la reducción de lípidos (Tabla 33). Al igual que el bioensayo B2, control enzima BUZYME B3, control +B4 y +B2; también siguen un patrón siendo iguales entre sí.

Por otro lado, se observó que el control enzima BUZYME B3 y los Controles positivos B1, B2, B3 y B4 fueron iguales entre sí. Los resultados mostraron que el comportamiento de la enzima comercial a 35°C fue igual al de los controles a temperatura de 20 y 35°C, lo cual podría deberse a que microorganismos propios del sustrato M7, contribuyeron a reducir grasas (Tabla 33).

El bioensayo B1 mostró resultados similares a aquellos de los controles negativos B1, B2, B3 y B4 (Tabla 11) reduciendo el contenido de grasa de 24.28% a 4.71% y 4.76% para los bioensayos B1(a) y B1(b) respectivamente (Tabla 37).

Tabla 33. Análisis comparativo de Tukey Kramer sobre el %DL del efluente AB, con la cepa BL18-06.

Bioensayos	Número de réplicas	Media	Agrupación					
BUZYME B2	2	95.315	A					
BUZYME B4	2	93.290	A	B				
B4	2	93.026	A	B				
BUZYME B1	2	91.351		B	C			
B3	2	89.880		B	C			
B2	2	89.207			C	D		
BUZYME B3	2	88.180			C	D	E	
Control +B4	2	88.012			C	D	E	
Control +B2	2	86.20				D	E	
Control +B3	2	85.70					E	
Control +B1	2	85.360					E	
B1	2	80.4847						F
Control –B4	2	78.6257						F
Control –B3	2	78.574						F
Control –B1	2	77.402						F
Control –B2	2	77.090						F

Fuente: elaboración propia (2022).

Los resultados del ANOVA de una sola vía; mostraron que existía una diferencia significativa entre los bioensayos y sus controles experimentales. ($p < 0.05$) (Anexo 13, tabla 34).

Se cumplió el supuesto de normalidad con un valor de Anderson-Darling de 0.173 mayor a 0.05. El supuesto de igualdad de varianzas también cumplió con un valor de probabilidad con la prueba de Bartlett de 0.391 mayor a 0.05. Por último, el supuesto de la independencia de los errores fue aceptado.

El análisis comparativo de Tukey Kramer y el análisis de varianza de una sola vía de ANOVA con respecto a la cepa BL18-06 mostraron que los datos se ajustaban a los valores esperados dado que tenían valores de Desviación estándar pequeñas (Anexo 14, tabla 35).

El análisis de Tukey Kramer sobre el porcentaje de desproteínización (%DP) con la cepa BL18-06, permitió determinar que los resultados de todos los bioensayos B4, B2, B3 y B1 fueron significativamente diferentes de los controles positivos, negativos y BUZYME 7707 (Tabla 36). La hidrólisis de proteínas durante el bioensayo B4 con la cepa BL18-06 logró reducir el contenido de proteínas de 29.49% a 11% (Tabla 37) es decir que esta cepa mostró ser proteolítica y lipolítica. Además, los bioensayos B4(a) y B4(b) presentaron los porcentajes más altos de desproteínización de 61.72% y 62.45% respectivamente (Tabla 37).

También se observó que todos los controles positivos fueron similares entre si y significativamente diferentes de los demás bioensayos; estos lograron reducir proteínas, pero en menor porcentaje de 29.49% a 24%, a 25%, a 20% y a 30% en los controles positivos B1, B2, B3 y B4 respectivamente; lo cual podría deberse a la presencia de microorganismos propios del sustrato M7 contribuyendo a la reducción de proteínas.

Se observó un patrón similar entre todos los controles negativos y los controles de enzima BUZYME B1, BUZYME B3 y BUZYME B4 que fueron similares entre sí (Tabla 36); lo cual podría deberse a que el sustrato usado (M7) en los controles negativos tuvo un comportamiento similar a los ensayos con la enzima. Teniendo en cuenta que esta enzima comercial tiene como función ser un desengrasante (70) justificando los resultados.

Tabla 36. Análisis comparativo de Tukey Kramer sobre el %DP del efluente AB, con la cepa BL18-06.

Bioensayos	Número de réplicas	Media	Agrupación									
B4	2	62.086	A									
B2	2	48.16		B								
B3	2	37.925			C							
B1	2	34.192				D						
Control +B4	2	30.2675					E					
Control +B2	2	25.2706						F				
Control +B1	2	24.1921						F				
Control +B3	2	20.503							G			
Control -B1	2	5.718								H		
BUZYME B3	2	4.265								H	I	
Control -B4	2	4.0556								H	I	
Control -B2	2	3.9738								H	I	
BUZYME B1	2	3.943								H	I	
Control -B3	2	3.936								H	I	
BUZYME B4	2	3.924								H	I	
BUZYME B2	2	3.521										I

Fuente: elaboración propia (2022).

Tabla 37. Cuadro con los datos de contenido inicial y final de grasa y proteína del sustrato M7, los porcentajes de deslipidificación y desproteínización (%DL y % DP) y valores de DBO₅ posteriores a los bioensayos de hidrólisis, así como los porcentajes de DBO₅ reducidos con la cepa BL18-06.

Ensayo	Parámetros					
	DBO ₅	%DBO ₅	%Grasa	%DL	%Proteína	%DP
M7	8257.5	-	24.28	-	29.49	-
B1(a)	4927.5	40.33	4.72	80.58	19.55	33.73
B1(b)	4845	41.33	4.76	80.39	19.27	34.65
B2(a)	4445	46.17	2.54	89.53	15.19	48.51
B2(b)	4710	42.96	2.7	88.88	15.39	47.81
B3(a)	5390	34.73	2.30	90.51	18.29	37.99
B3(b)	5207.5	36.94	2.61	89.24	18.33	37.85
B4(a)	3642.5	55.89	1.47	93.94	11.29	61.72
B4(b)	3255	60.58	1.91	92.10	11.07	62.45
Control+B1(a)	7457.5	9.69	3.45	85.77	22.37	24.15
Control+B1(b)	7437.5	9.93	3.65	84.95	22.34	24.24
Control+B2(a)	7012.5	15.08	3.03	87.50	22.02	25.34
Control+B2(b)	7042.5	14.71	3.66	84.90	22.06	25.20
Control+B3(a)	6210	24.8	3.72	84.64	23.49	20.36
Control+B3(b)	6267.5	29.1	3.22	86.75	23.40	20.64
Control+B4(a)	5930	28.19	2.97	87.79	20.57	30.25
Control+B4(b)	5907.5	28.45	2.85	88.24	20.56	30.29
Control-B1(a)	6130	25.76	5.66	76.67	27.88	5.49
Control-B1(b)	6447.5	21.92	5.30	78.13	27.74	5.94
Control-B2(a)	5167.5	37.42	5.66	76.67	28.35	3.89
Control-B2(b)	5010	39.33	5.46	77.51	28.29	4.06
Control-B3(a)	5675	31.27	5.32	78.07	28.41	3.67
Control-B3(b)	5907.5	28.46	5.08	79.07	28.26	4.19
Control-B4(a)	4577.5	44.57	5.18	78.66	28.31	4.01
Control-B4(b)	4685	43.26	5.19	78.58	28.28	4.10
BUZYME B1(a)	6770	18.01	2.12	91.24	28.52	3.30
BUZYME B1(b)	6917.5	16.23	2.07	91.46	28.14	4.59
BUZYME B2(a)	6382.5	22.71	1.16	95.21	28.65	2.86
BUZYME B2(b)	6500	21.28	1.11	95.42	28.26	4.18
BUZYME B3(a)	6712.5	18.71	2.93	87.92	28.35	3.88
BUZYME B3(b)	6922.5	16.17	2.80	88.44	28.12	4.65
BUZYME B4(a)	6810	17.53	1.46	93.97	28.28	4.12
BUZYME B4(b)	6927.5	16.11	1.79	92.60	28.39	3.73

Fuente: elaboración propia (2022).

4.5.2.2. Análisis del diseño factorial 2^2 del bioproceso de desproteínización, deslipidificación y DBO_5 con la cepa BL18-06

Para el análisis de los resultados del porcentaje de reducción de la Demanda Bioquímica de Oxígeno utilizando la cepa BL18-06; se hizo un diseño factorial 2^2 , un ANOVA tipo factorial y una regresión lineal múltiple ya que se utilizó dos predictores para ver que variable individual y de interacción (temperatura y tiempo) tuvo mayor influencia sobre la DBO_5 . El efecto más importante sobre el bioproceso fue el efecto de interacción doble Temperatura*Tiempo (AB), seguido del efecto individual Tiempo (B) (Anexo 15, tabla 38). El modelo mostro un valor p de 0.002 menor a 0.05 indicando que el modelo es capaz de predecir y explicar la reducción de la materia orgánica (% DBO_5) empleando la cepa BL18-06.

Para validar estos resultados se hizo la validación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los errores. Además, se realizó una ecuación de predicción del análisis de regresión lineal múltiple. Para el caso de la normalidad los residuos seguían una distribución normal, con un factor de Anderson-Darling 0.168 y un valor p de 0.899 mayor a 0.05. También se cumplió el supuesto de igualdad de varianzas con un valor de 0.700 para la Prueba de Bartlett ya que los datos encontrados tenían varianzas iguales. Además, se cumplió el supuesto para la independencia de los errores sobre los residuos de la DBO_5 ya que estos no seguían un patrón definido.

El factor de inflación de varianza (FIV) fue de 1 para todos los efectos, deduciendo que los factores son independientes y no existe colinealidad entre ellos según la Tabla 38.

En el análisis de varianza y de regresión lineal múltiple se observó un coeficiente de determinación ajustado (R^2 aj) de 94.16 tal como se ve en la Tabla 38, indicando que el modelo se ajusta a los datos y explica el 94.16 de la reducción del porcentaje de la DBO_5 por acción de la cepa BL18-06 en el sustrato M7.

Mediante el análisis de regresión lineal múltiple se obtuvo la siguiente ecuación de predicción:

$$\text{DBO}_5 = 58.06 - 0.955 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) - 1.322 \text{ Tiempo (h)} - 0.0778 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Tiempo (h)}$$

A partir de esta ecuación de predicción con la cepa BL18-06 se obtuvo las mejores condiciones de operación que fueron a 35°C durante 24 horas.

De la misma manera se analizó los resultados del %DL; primero se realizó un diseño factorial 2^2 , luego se hizo un ANOVA tipo factorial y una regresión lineal múltiple ya que se utilizó dos

predictores para determinar que variable individual y de interacción (temperatura y tiempo) que tuvo mayor influencia sobre el bioproceso del %DL. Todos los efectos tanto individuales como de interacción doble fueron significativos para explicar el bioproceso en estudio (Anexo 16, tabla 39). El modelo logró explicar el proceso ($p < 0.05$). El efecto más importante sobre el bioproceso fue el efecto de interacción doble Temperatura*Tiempo (AB), seguido del efecto individual Temperatura (A) en concordancia con lo reportado por Gutiérrez y De la Vara (2008)(52).

En el caso de la normalidad los residuos seguían una distribución normal ya que mostró un factor de Anderson-Darling de 0.109 y un valor p de 0.987 mayor a 0.05. También se cumplió el supuesto de igualdad de varianzas, ya que los residuos no seguían un patrón definido dando un valor de probabilidad según la prueba de Bartlett de 0.454 mayor a 0.05. Por último, la independencia de los errores mostró que los residuos no seguían un patrón definido, aceptándose este supuesto.

El factor de inflación de varianza (FIV) fue de 1 para todos los efectos, deduciendo que los factores son independientes y no existe colinealidad entre ellos.

Para el análisis de varianza y de regresión lineal múltiple se observó un coeficiente de determinación ajustado (R^2 aj) de 97.31 (Tabla 39), que indicó que el modelo se ajusta bien a los datos y que explica el 97.31 de la reducción de grasas por acción de la cepa BL18-06.

Por último, mediante análisis de regresión lineal múltiple se obtuvo la siguiente ecuación de predicción:

$$\%DL = 59.88 + 0.8123 \text{ Temperatura } (^{\circ}C) + 1.010 \text{ Tiempo (h)} - 0.02324 \text{ Temperatura } (^{\circ}C) * \text{Tiempo (h)}$$

A partir de esta ecuación de predicción de la cepa BL18-06 se obtuvo las mejores condiciones de operación para la reducción de grasas que fueron a 35°C durante 24 horas.

Todos los efectos tanto individuales como de interacción doble fueron significativos para explicar el bioproceso en estudio (Anexo 17, tabla 40). El modelo mostró un valor $p < 0.05$ indicando que el modelo es capaz de predecir y explicar la reducción de proteínas (%DP) empleando la cepa BL18-06. El efecto más importante sobre el bioproceso fue el de interacción doble Temperatura*Tiempo (AB), seguido del efecto individual Tiempo (B) tal como se observa en la Tabla 40.

Para el caso de la normalidad los residuos seguían una distribución normal, con un valor de Anderson-Darling 0.203 y un valor p de 0.811 mayor a 0.05. Se cumplió el supuesto de homocedasticidad, ya que los residuos no seguían un patrón definido dando un valor de probabilidad según la prueba de Bartlett de 0.551 mayor a 0.05. En el caso de la independencia de los errores también se cumplió el supuesto ya que estos no seguían un patrón definido.

El factor de inflación de varianza (FIV) fue de 1 para todos los efectos, deduciéndose que los factores son independientes y no existe colinealidad entre ellos.

Para el análisis de varianza y de regresión lineal múltiple se observó un coeficiente de determinación ajustado (R^2 aj) de 99.99 (Anexo 17, tabla 40), que indicó que el modelo se ajusta a los datos y que explica el 99.99 de la reducción de proteínas por acción de la cepa BL18-06.

Por último, se realizó el análisis de regresión lineal múltiple y se obtuvo la siguiente ecuación de predicción:

$$\%DP = -40.856 + 1.5566 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) + 4.8382 \text{ Tiempo (h)} - 0.04359 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Tiempo (h)}$$

Con esta ecuación de predicción con la cepa BG18-03 se logró obtener las mejores condiciones de operación que fueron a 35°C durante 24 horas.

Las mejores condiciones de proceso para la cepa BL18-03 que permitió la mayor deslipidificación, desproteínización y por ende la mayor reducción en el contenido orgánico fueron 35°C y 24 horas con el bioensayo B4.

4.5.3. Análisis comparativo de Tukey Kramer para las mejores condiciones de operación con las cepas BG18-03 y BL18-06.

Finalmente se hizo una comparación con la prueba de Tukey Kramer para determinar que cepa fue mejor para desproteínizar y deslipidificar el efluente, a las condiciones óptimas de operación de 35°C a 24, y lograr reducir materia orgánica (%DBO₅).

Las cepas BG18-03 y BL18-06 mostraron un comportamiento similar sobre el proceso de reducción de materia orgánica (%DBO₅) (Tabla 42) con un coeficiente de determinación ajustado de 85.37 (Anexo 18, tabla 41) deduciéndose que tanto BG18-03 y BL18-06 fueron capaces de reducir la materia orgánica del sustrato en estudio, teniendo potencial para el tratamiento biológico de efluentes pesqueros.

Tabla N°42. Análisis comparativo de Tukey Kramer sobre la reducción de materia orgánica (%DBO₅) para las cepas BG18-03 y BL18-06.

Cepa	N	Media	Agrupación
BG18-03	2	69.120	A
BL18-06	2	58.23	A

Fuente: elaboración propia (2022).

Los resultados para las comparaciones de deslipidificación (%DL) mostraron que la desviación estándar para la cepa BG18-03 se ajustó al modelo porque fue pequeño (Anexo 19, tabla 43), mientras que la cepa BL18-06 no se ajustó al modelo esperado ya que su desviación estándar fue alta. Además, se determinó que ambas cepas mostraron un comportamiento similar sobre el proceso de deslipidificación con un coeficiente de determinación ajustado de 73.83 (Tabla 44) deduciéndose que tanto BG18-03 y BL18-06 fueron capaces de reducir las grasas del sustrato en estudio, teniendo potencial para el tratamiento biológico de efluentes pesqueros.

Tabla N°44. Análisis comparativo de Tukey Kramer sobre el %DL para las cepas BG18-03 y BL18-06.

Cepa	N	Media	Agrupación
BG18-03	2	96.030	A
BL18-06	2	93.026	A

Fuente: elaboración propia (2022).

También se hizo una comparación con Tukey Kramer para los resultados del %DP mostrando que la desviación estándar para la cepa BG18-03 se ajustó al modelo porque fue pequeño (Anexo 20, tabla 45), mientras que la cepa BL18-06 no se ajustó al modelo esperado ya que su desviación estándar fue alta. Además, se determinó que ambas cepas son significativamente diferentes entre sí sobre el proceso de desproteínización con un coeficiente de determinación ajustado de 99.96 (Tabla 46) lo que quiere decir que la mejor cepa para reducir proteínas a temperatura 35°C y 24 horas es la BG18-03, mientras que BL18-06 tiene mejor comportamiento lipolítico. Por ello se recomendaría profundizar su estudio para probarlas a

escala industrial si se quisiera implementar un sistema de tratamiento biológico para los efluentes pesqueros.

Tabla N°46. Análisis comparativo de Tukey Kramer sobre el %DP para las cepas BG18-03 y BL18-06.

Cepa	N	Media	Agrupación
BG18-03	2	93.1243	A
BL18-06	2	62.086	B

Fuente: elaboración propia (2022).

4.5.4. Discusión de los resultados de los bioprocesos y del efecto de las variables sobre la reducción de la materia orgánica (%DBO₅ reducido), %DL y %DP.

Las cepas bacterianas estudiadas en el presente trabajo BG18-03 y BL18-06 lograron reducir la materia orgánica (%DBO₅), hidrolizar proteínas (%DP) y grasas (%DL) del efluente agua de bombeo. En la tabla 47 se consolida los 2 bioensayos con sus duplicados a las mejores condiciones de proceso encontradas mediante el diseño. También se puede observar en el Anexo 2 los resultados de todos los ensayos.

Los resultados obtenidos para las dos cepas estudiadas indican que la cepa BG18-03 fue la mejor reduciendo materia orgánica (%DBO₅), en los bioensayos B8 (a) y B8 (b) (70.07, 68.17 %) evidenciándose valores finales de DBO₅ de 2678 y 2848 mg/L respectivamente. La cepa que presentó mejores resultados para la reducción de proteínas fue la BG18-03 en los bioensayos B8 (a) y B8 (b) (93.16 y 93.09%) obteniéndose contenidos finales de proteínas de 2.42 y 2.45% respectivamente. La cepa que logró reducir la mayor cantidad de grasas fue también la BG18-03 en los bioensayos B8 (a) y B8 (b) (96.37, 95.69%) evidenciándose contenidos finales de grasas de 1.06 y 1.26% respectivamente. No obstante, los resultados para la cepa BL18-06 fueron muy cercanos a los de la cepa BG18-03 en los bioensayos de deslipidificación (%DL), a diferencia de todos los demás bioensayos (%DBO₅ y %DP) que superaron el 50% de reducción de los indicadores estudiados.

Resultados similares a los encontrados en este trabajo fueron evidenciados por Marín *et al.* (2015) quienes lograron remover materia orgánica medida como DBO₅, durante el tratamiento de efluentes de la industria pesquera utilizando reactores anaeróbicos, desde valores iniciales de 2290.3 mg/L hasta remover cantidades de materia orgánica entre 174.85 mg/L y 781.80 mg/L con un porcentaje de remoción de 38% a 46% (19). Comparando los resultados

encontrados en este trabajo se pudo ver que se redujo la DBO₅ en 5495 mg/L desde valores iniciales de 8257.5 mg/L con un porcentaje de remoción de 70%. Adicionalmente Aspé *et al.* (2001) durante el tratamiento de aguas residuales de la industria pesquera, lograron remover materia orgánica (%DBO₅) hasta en 96% utilizando sedimentos marinos como fuente de inóculo en reactores anaeróbicos (71). De forma similar Li *et al.* (2014) removieron hasta en 79% materia orgánica de un efluente sintético salino utilizando un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) (72). Como afirman Atlas y Bartha (2002), que uno de los objetivos planteados sobre los efluentes residuales es la reducción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) asociada a la materia orgánica en suspensión y disuelta, mencionan métodos biológicos para reducir la DBO₅ de efluentes residuales, tales como los filtros biológicos que utilizan microorganismos como la *Zooglea ramigera* que tiene la capacidad de producir grandes cantidades de polisacáridos extracelulares que logran atrapar gran cantidad de materia orgánica presente en estos efluentes (62). Al igual que la bacteria en estudio *Aeromonas sp.* que mostró ser capaz de reducir materia orgánica en 70%. Por otra parte, Azad *et al.* (2001) logró reducir la demanda química de oxígeno en un 77% después de 120 horas de cultivo, además de disminuir significativamente el contenido de proteínas soluble y carotenoides totales en subproductos de sardina usando biorreactores con *Rhodovulum sulphophilum* (57).

Para el caso de la reducción de proteínas se encontró resultados similares reportados por Zamora *et al.* (2007) que logró remover 83% de proteínas utilizando esteras microbianas conformadas por cianobacterias y proteobacterias para la biorremediación de efluentes pesqueros (25). A su vez Marín *et al.* (2015) reportó porcentajes de remoción de nitrógeno total Kjeldahl de 24.6, 28.9 y 37.2% durante el tratamiento de efluentes pesqueros (19). Los resultados encontrados en el presente trabajo son alentadores considerando que el nivel de desproteinización logrado fue de 93%. De forma similar Jemli *et al.* (2015) reportó la reducción de niveles de nitrógeno en aguas residuales del procesamiento de pescado con altas concentraciones de sal, utilizando bacterias halotolerantes de la familia *Proteobacteria* (*Halomonadaceae* y *Flavobacteriaceae*) y la remoción de materia orgánica de hasta entre 97.9% y 98.6% utilizando biorreactores de membrana (73).

Ambas cepas en estudio (BG18-03 y BL18-06) demostraron reducir eficientemente el contenido de lípidos hasta un 90% (tabla 47), se encontró reportes de resultados similares por Alexandre *et al.* (2011), que lograron la reducción del contenido de grasas y aceites (1500 mg/L) de los sustratos de aguas residuales provenientes del procesamiento de harina de pescado; utilizando al hongo *P. simplicissimum*. Obteniéndose mejores resultados utilizando

sustratos que recibieron previamente una etapa de prehidrólisis (24). De la misma manera Prasad y Manjunath (2011) utilizaron un consorcio bacteriano compuesto por *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *Serratia marsencens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* que lograron reducir el contenido de lípidos de 25000 mg/L a -80 mg/L y también redujeron valores de DBO de 3200 mg/L a -40mg/L de aguas residuales con alto contenido de lípidos (74). De igual forma Mongkolthanaruk y Dharmstithi (2002) utilizaron un consorcio bacteriano compuesto por *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* y *Acinetobacter calcoaceticus* para el tratamiento de aguas residuales ricos en contenido lipídico; logrando reducir el valor de DBO de 3500 mg/L a XX mg/L y el contenido de lípidos de 20, 000 mg/L, ambos valores a menos de 20 mg/L durante 12 días en condiciones anaerobias (75).

Tabla 47. Reducción de la materia orgánica (% de reducción de DBO₅), %DL y %DP del efluente agua de bombeo que mostraron los mejores resultados con las cepas BG18-03 y BL18-06.

Bioensayo	Reducción de materia orgánica (% de reducción de DBO ₅)	DBO ₅ (mg/L)	%DP	Contenido final de proteína.	%DL	Contenido final de grasa.	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)
BL18-06 B4 (a)	55.89	3643	61.72	11.29	93.94	1.47	35	24
BL18-06 B4 (b)	60.58	3255	62.45	11.07	92.11	1.92	35	24
BG18-03 B8 (a)	70.07	2678	93.16	2.42	96.37	1.06	35	24
BG18-03 B8 (b)	68.17	2848	93.09	2.45	95.69	1.26	35	24

Fuente: elaboración propia (2022).

CONCLUSIONES

1. De las cuatro cepas bacterianas evaluadas, dos fueron seleccionadas para ser utilizadas en los bioensayos de hidrólisis, en razón de sus mejores capacidades proteolíticas (BG18-03) y lipolíticas (BL18-06).
2. De las cepas seleccionadas; la cepa proteolítica BG18-03 fue caracterizada como un bacilo Gram negativo e identificada como una cepa *Aeromonas hydrophila/caviae* con 83.9% de probabilidad. También la cepa lipolítica BL18-06 mostró ser un bacilo Gram negativo y fue identificada como una cepa *Aeromonas hydrophila/caviae* con 99.9% de probabilidad.
3. Se realizó bioensayos de desproteínización y deslipidificación para observar los mejores valores en reducción de grasas, proteínas y niveles de DBO₅ en los sustratos M1 y M7. Durante los bioprocesos se obtuvo que el contenido inicial de proteínas en el sustrato M1 fue de 35.43% y de grasas fue de 29.19%. Mientras que el contenido inicial de grasas en el sustrato M7 fue de 24.28% y de proteínas fue de 29.49%.
4. De la caracterización de los bioprocesos se obtuvo que la cepa BG18-03 fue la más eficiente en hidrolizar las proteínas con un %DP de 93.12 %, logrando reducir el contenido proteico de 35.43% hasta 2.44% en el sustrato agua de bombeo M1. También se observó que las cepas BL18-06 y BG18-03 fueron capaces de hidrolizar lípidos con un %DL superior al 90%, logrando reducir el contenido de grasas de 24.28% hasta 1.69 y de 29.19% hasta 1.16% en los sustratos M7 y M1 respectivamente. Además, las cepas en estudio redujeron el contenido lipídico en el sustrato M7 a niveles similares a los obtenidos con la enzima comercial BUZYME 7707, la cual redujo los lípidos en 95.32%. Por lo tanto, las cepas BG18-03 y BL18-03 podrían ser consideradas para escalamiento a futuro.
5. Las mejores condiciones de operación con la cepa BG18-03 para reducir el contenido de proteínas, grasas y DBO₅ en el sustrato agua de bombeo M1, usando el análisis de un diseño factorial de tipo 2², fueron:
 - Para desproteínización: 35°C durante 24 horas.
 - Para deslipidificación: 35°C durante 24 horas.
 - Para reducción de materia orgánica (DBO₅): 20°C durante 24 horas.

Mientras que las mejores condiciones de operación con la cepa BL18-06 para reducir el contenido de proteínas, grasas y DBO₅ en el sustrato agua de bombeo M7, usando el análisis de un diseño factorial de tipo 2², fueron:

- Para desproteínización: 35°C durante 24 horas.
- Para deslipidificación: 35°C durante 24 horas.

- Para reducción de materia orgánica (DBO_5): 35°C durante 24 horas.



RECOMENDACIONES

1. Se recomienda utilizar métodos moleculares de ARNr 16S para la identificación de las cepas bacterianas en estudio a nivel de especie dentro del género *Aeromonas* lo cual ha sido resaltado por otros autores como Germán y colaboradores (2011) (65).
2. Se sugiere optimizar el bioproceso de hidrólisis enzimático del efluente agua de bombeo utilizando la cepa BG18-03, para lograr obtener las mejores condiciones de operación y permitan la máxima reducción de materia orgánica de este efluente, como paso previo al escalamiento y posible uso de esta cepa en pruebas semi-piloto y piloto.
3. Se recomienda optimizar los bioprocesos de desproteinización y deslipidificación del efluente agua de bombeo utilizando la cepa BG18-03, para lograr obtener las mejores condiciones de operación y permitan la máxima reducción proteínas y grasas de este efluente, y así lograr el escalamiento y posible uso de esta cepa en pruebas semi-piloto y piloto.
4. Se sugiere realizar estudios que permitan la purificación y caracterización de las enzimas extracelulares obtenidas en este estudio para su máximo aprovechamiento en la industria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN. Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2019. 2019;15–81.
2. PRODUCCIÓN MD LA. Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2018. 2018;20–102.
3. Luis J, Villanueva S. “Efecto de la aplicación de nuevas tecnologías en el tratamiento de las aguas de bombeo, sobre la calidad de los efluentes de la empresa pesquera Pelayo S.A.C. de harina y aceite de pescado de puerto Supe.” Universidad Nacional de Trujillo; 2016.
4. Lujan Carbajal NX. Caracterización de efluentes de una industria pesquera de consumo humano directo y su grado de cumplimiento con las normas vigentes (2014-2016). Universidad Nacional Agraria La Molina; 2019.
5. Cabrera P, Collota S. Diseño y construcción de un sistema de flotación por aire disuelto, de efluentes líquidos, a nivel de laboratorio. Revista Peruana de Química e Ingeniería Química. 2000;3:51–7.
6. Cabral Cerra JC. “Análisis del grado de cumplimiento de la calidad de los efluentes en los EIP en la bahía de Chimbote (2012-2016).” Universidad Agraria la Molina; 2020.
7. PRODUCCIÓN MD LA. Límites Máximos Permisibles (LMP) para la Industria de Harina y Aceite de Pescado y Normas Complementarias. El Peruano. 2008 Apr;10:3.
8. PRODUCCIÓN MD LA. Protocolo para el Monitoreo de Efluentes de los Establecimientos Industriales Pesqueros de Consumo Humano Directo e Indirecto 2020. 2020;(511).
9. Paredes Concepción P. Producción más limpia y el manejo de efluentes en plantas de harina y aceite de pescado. Industrial Data. 2014 Oct;17(2):72–80.
10. Pizarro C R, Reátegui S S, Rivera C D, Delmás R I, Mori S L. Tratamiento de efluentes líquidos en la industria de harina de pescado. 2001;3:73–8.
11. Carballido Ocaña VC. Tratamiento de Efluentes Líquidos Generados por el Proceso de Harina y Aceite de Pescado Acorde al Decreto Supremo N° 010-2008 –PRODUCE. Universidad Privada del Norte; 2018.

12. Kleeberg-Hidalgo F, Rojas-Delgado M. Generalidades del recurso hidrobiológico para la producción de la industria pesquera peruana. Vol. 0, Ingeniería Industrial. Lima-Perú; 2011.
13. Sifuentes-Penagos G, León-Vásquez S, Castillo A. Hydrolysis of proteins from anchovy (*Engraulis ringens*) whole by action of the ProtamexTM enzyme. Vol. 9, Scientia Agropecuaria. Chimbote- Perú; 2018.
14. Kleeberg Hidalgo F, Rojas Delgado M, Arroyo Gordillo P. La industria pesquera en el Perú. Vol. 53, Fondo Editorial, Universidad de Lima. Lima-Perú; 2018.
15. PRODUCE. Guía de elaboración de estudios de impacto ambiental para la actividad de consumo indirecto harina y aceite de pescado. PRODUCE 2008 Lima-Perú; 2008 p. 45.
16. Espinoza Goinochea JC. Gestión de los efluentes líquidos generados en la planta de harina y aceite de pescado, de la empresa Corporación PFG- Centinela SAC para su evaluación y dictamen respectivo. Universidad Nacional de Trujillo; 2014.
17. Carranza CC. Compatibilidad ambiental de la industria de harina de pescado en Paracas - Pisco. Rev del instituto de investigación (RIIGEO), FIGMMG-UNMSM. 1999 Jan;2:1–10.
18. García Sifuentes CO, Pacheco Aguilar R, Valdez Hurtado S, Márquez Rios E, Lugo Sánchez ME, Ezquerria Brauer JM. Impacto del agua de cola de la industria pesquera : tratamientos y usos. C y TA. 2009;7(1):67–77.
19. Marín Leal JC, Chinga Panta CA, Velásquez Ferrín AI, Gonzáles Cabo PA, Zambrano Rodríguez LM. Tratamiento de aguas residuales de una industria procesadora de pescado en reactores anaeróbicos discontinuos. Cienc e Ing Neogranadina. 2015;25(1):27–42.
20. Gonzáles S, Farías J, Gonzalez J, Murialdo SE. reduction of contaminant loads in effluents from fish flour factories in the port of Mar del Plata. Scinetia Interfluvius. 2010;1:52–63.
21. Espinoza Villegas MI. Propuesta de adición de lodos recuperados del agua de bombeo para mejorar el rendimiento de harina de pescado en una empresa pesquera. Universidad Nacional de Trujillo; 2016.

22. Guzman Serrano WI, Jhon David, Pastor Lorenzo J. Efecto de microorganismos eficaces en el tratamiento de sanguaza proveniente de la empresa pesquera Panafoods S.a.C. Universidad Nacional del Santa; 2020.
23. Arias-Lizárraga DM, Méndez-Gómez E. Remoción de sólidos en aguas residuales de la industria harinera de pescado empleando biopolímeros. *Tecnol y Ciencias del Agua*. 2014;3:115–23.
24. Alexandre VMF, Valente AM, Cammarota MC, Freire DMG. Performance of anaerobic bioreactor treating fish-processing plant wastewater pre-hydrolyzed with a solid enzyme pool. *Renew Energy*. 2011;36(12):3439–44.
25. Zamora Castro J, Paniagua Michel J, Lezama Cervantes C. A novel approach for bioremediation of a coastal marine wastewater effluent based on artificial microbial mats. *Mar Biotechnol*. 2007;10(2):181–9.
26. Monterroso JL. Estudio de los efluentes del procesamiento de pota en Piura y su potencial uso como fertilizante. Universidad de Piura; 2011.
27. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock. *Biología de los Microorganismos*. 2004. p. 1089.
28. Primo Yufera E. *Química orgánica básica y aplicada*. Vol. 2. Barcelona-España: REVERTÉ; 2012. 948 p.
29. Hernández AM. Determinación de sólidos suspendidos totales en agua secados. Subdirección Hidrol - Grup Lab Calid Ambient. 2007;3:1–4.
30. Ministerio de la producción. Guía para la actualización del plan de manejo ambiental para que los titulares de los establecimientos industriales pesqueros alcancen el cumplimiento de los límites máximos permisibles (LMP) aprobados por decreto supremo N° 010- 2008-PRODUCE. 2008;6–24.
31. Coronado Cuadros N. “análisis temporal de parametros físico-químicos de calidad de efluentes en establecimientos industriales pesqueros - Bahía del Callao (periodo 2012-2016).” Universidad Nacional Agraria la Molina; 2018.
32. Stanier RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. *General Microbiology*. Fifth. 1987. 689 p.

33. Oren A. Halophilic microbial communities and their environments. Curr Opin Biotechnol. 2015;33:119–24.
34. Buleje V. “Obtención de cepas bacterianas productoras de enzimas de interés industrial a partir de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931).” Universidad Nacional Federico Villareal; 2017.
35. León J, Pellón FJ, Unda V, David J, Anaya C, Mendoza V. Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marinos. Rev Peru Biol. 2000;7(2):202–10.
36. Latif Eugénín FL. Aeromonas , un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal. Universitat Rovira i Virgili; 2016.
37. Pucci GN, Acuña AJ, Llanes ML, Tiedemann MC, Pucci OH. Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 2009;44(1):49–58.
38. Bravo Fariñas L, Cabrera Rodríguez L, Ramírez Álvarez M, Llop Hernández A, Verdecía Pérez J, Borrego Hernández G, et al. Resistencia antimicrobiana en cepas de “Aeromonas” spp. aisladas de pacientes con bacteriemia. Rev Biomédica. 2007;18(3):176–81.
39. Majano Mendoza A, Bravo Fariñas L, Fernández Abreu A, Martínez Motas I, Núñez F, Mederos L, et al. Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos anaerobios facultativos oxidasa positiva, aislados de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba. Rev Biomédica. 2009;20(1):25–32.
40. Nieto TP, Ellis AE. Characterization of extracellular metallo- and serine-proteases of *Aeromonas hydrophila* Strain B51. J Gen Microbiol. 1986;132(7):1975–9.
41. Sánchez T, León J, Woolcott J, Arauco K. Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. Vol. 11, Rev. peru. biol. 2004.
42. Guadix A, Guadix E, Paez-Dueñas M, Gonzalez-Tello P, Camacho F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Ars Pharm. 2000;41(1):79–89.

43. Gaviria Acosta E, Benítez Benítez R, Ienis L, Hoyos Concha Jose L. Optimización de la hidrólisis enzimática de proteínas presentes en semillas de Guandul (*Cajanus cajan*). Biotecnología en el Sect Agropecu y Agroindustrial. 2015;13(2):114.
44. Pagán J, Ibarz A, Falguera V, Benítez R. Enzymatic hydrolysis kinetics and nitrogen recovery in the protein hydrolysate production from pig bones. J Food Eng. 2013;119(3):655–9.
45. Gálvez RP. Optimización de las condiciones de operación en la hidrólisis enzimática de proteínas para la obtención de abonos orgánicos. Fungal Divers. 2006;
46. Hernández R, Martínez M. Las lipasas : enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial Lipases : enzymes having the potential for developing immobilised biocatalysts by interfacial adsorption. 2010;123–40.
47. Bornscheuer U, Reif OW, Lausch R, Freitag R, Scheper T, Kolisis FN, *et al*. Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. BBA - Gen Subj. 1994;1201(1):55–60.
48. Sarda L, Desnuelle P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. Biochim Biophys Acta. 1958;30(3):513–21.
49. Balcão VM, Paiva AL, Malcata FX. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. Enzyme Microb Technol. 1996;18(6):392–416.
50. Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnol Appl Biochem. 1999;29:119–31.
51. Montgomery DC. Introduction To Statistical Quality Control. Sixth Edit. Vol. 6, Plastics and rubber international. John Wiley & Sons; 2009. 754 p.
52. De la Vara R, Gutiérrez H. Análisis y diseño de experimentos. Cano A, Osorio M, editors. México, D. F: McGRAW-HILL/Interamericana editores, S.A. de C.V.; 2008. 1–537 p.
53. Perochena Escalante E. “Evaluación de consorcios bacterianos y condiciones de operación, para reducir el contenido de proteínas en residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) mediante bioprocesos de hidrólisis enzimática.” Universidad Católica de Santa María; 2019.

54. PRODUCCIÓN MD LA. Protocolo para el Monitoreo de Efluentes de los Establecimientos Industriales Pesqueros de Consumo Humano Directo e Indirecto 2019. 2019. p. 34.
55. Gram T, De S. Cristal violeta de Hucker Procedimiento de Tinción (Tinción Gram). :10–1.
56. Et I, Du O, Aux API, Et R, Necessaires M, Non M, et al. 20 NE. 2009;
57. Azad SA, Vikineswary S, Ramachandran KB, Chong VC. Growth and production of biomass of *Rhodovulum suldophilum* in sardine processing wastewater. 2001;264–8.
58. IDEAM. Demanda Bioquímica de Oxígeno. 2007.
59. Nations F and agriculture organization of the united. Food analysis general techniques, additives, contaminants, and composition. Vol. 111, The British Journal of Psychiatry. Rome; 1986. 1009–1010 p.
60. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). In P. A. Cunniff (Ed.), Official methods of analysis of AOAC international (16th ed.. Arlington, Virginia, USA: AOAC International. Assoc Off Agric Chem. 1997;1(Volume 1).
61. Flores-Fernández ML, Zavaleta AI, Chávez-Hidalgo el. bacterias halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana San Martín Halotolerant bacteria with lipolytic activity isolated from Pilluana Salterns -San Martin. Rev Investig UNMSM. 2010;13(2):87–91.
62. Atlas RM, Bartha R. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. 4ta ed. Madrid: Addison Wesley; 2002. 696 p.
63. Arauco P. K, Woolcott H. JC, León Q. J, Galarreta H, Sánchez R. T. Optimización De Parámetros Cinéticos De Bacterias Proteolíticas Aisladas De Ambientes Marinos Contaminados. Rev Peru Química e Ing Química. 2004;7(1):56–62.
64. Castro Escarpulli G, Aguilera Arreola MG, Cerezo SG, Hernández Rodríguez CH, Rodríguez Chacón M, Soler Falgás L, et al. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 2002;22(4):206–16.

65. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(8):601–8.
66. Gupta R, Rath P, Gupta N, Bradoo S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol Appl Biochem*. 2003;37(1):63–9.
67. Jaeger K-E, Kovacic F. *Pseudomonas* Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. *Methods Mol Biol*. 2014;1149:111–30.
68. GARCÍA CARREÑO FL, HAARD NF. Characterization of Proteinase classes in Langostilla (*Pleuroncodes Planipes*) and crayfish (*Pacifastacus Astacus*) Extracts. *J Food Biochem*. 1993;17(2):97–113.
69. Pizarro R, Pizarro R, Reátegui S, Arroyo J, Rivera D, Delmas I. Efecto De La Adición De Microorganismos En El Tratamiento De Efluentes Liquidos De La Industria De Harina De Pescado. *Rev Peru Química e Ing Química*. 2014;10(2):47–50.
70. Chemistry B. Buzyme 7707. 2018. p. 2.
71. Aspé E, Martí MC, Jara A, Roeckel M. Ammonia Inhibition in the Anaerobic Treatment of Fishery Effluents. *Water Environ Res*. 2001;73(2):154–64.
72. Li J, Yu L, Yu D, Wang D, Zhang P, Ji Z. Performance and granulation in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating saline sulfate wastewater. *Biodegradation*. 2014;25(1):127–36.
73. Jemli M, Karray F, Feki F, Loukil S, Mhiri N, Aloui F, et al. Biological treatment of fish processing wastewater: A case study from Sfax City (Southeastern Tunisia). *J Environ Sci (China)*. 2015;30:102–12.
74. Prasad MP, Manjunath K. Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. *Indian J Biotechnol*. 2011;10(1):121–4.
75. Mongkolthanaruk W, Dharmsthiti S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *Int Biodeterior Biodegrad* 50. 2012;50:101–5.

ANEXOS

Anexo 1

1. Caracterización microbiana

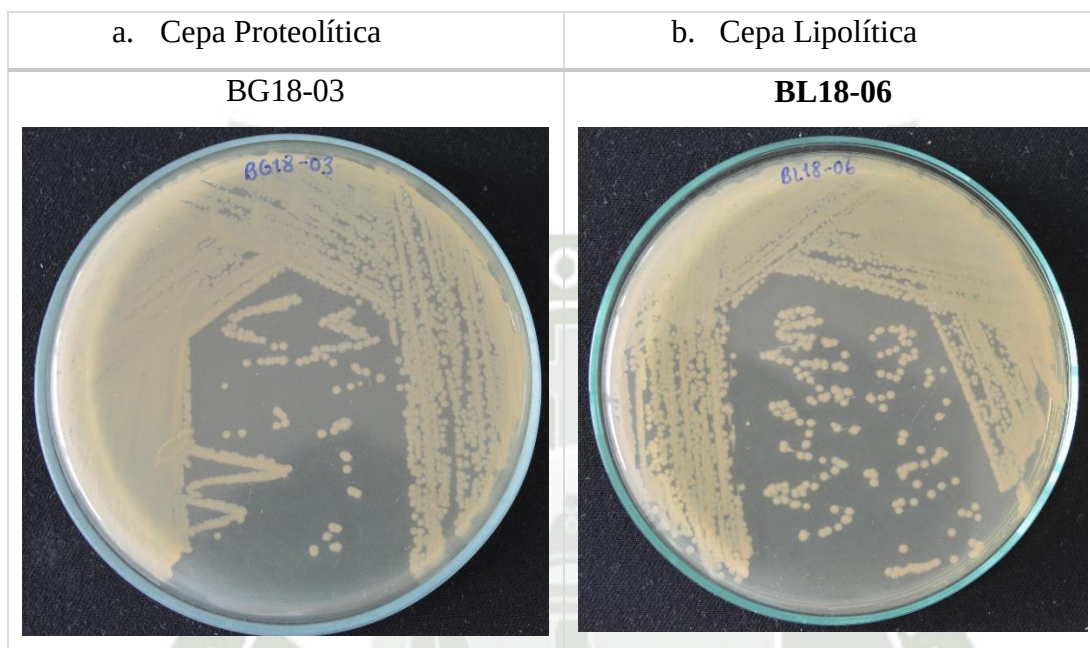


Figura N° 20. a. colonias de la cepa BG18-03 (proteolítica) en medio agar TSA y b. colonias de la cepa BL18-06 (lipolítica) en medio agar TSA.

Anexo 2

1. Diseño factorial 2² para los ensayos de deslipidificación con la cepa BL18-06

BIOENSAYOS DE DESLIPIDIFICACIÓN CON LA CEPA BL18-06			
N° ENSAYOS	CODIGO	AGUA DE BOMBEO (AB) M7: Sustrato hervido y recuperado solo el sobrenadante.	
		CONDICIONES	
		Diferentes	Similares
1	B1 (a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	Volumen de sustrato: 150 ml
1	B2 (a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	Volumen de inóculo: 1.5 ml
1	B3 (a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	Agitación: 180 rpm
1	B4 (a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	Aireación: 0.25 vvm
1	B1 (b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	pH inicial: 7
1	B2 (b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	
1	B3 (b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	
1	B4 (b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	

Fuente: elaboración propia (2022).

ENSAYOS DE DESLIPIDIFICACIÓN PARA LA CEPA BL18-06			
N° ENSAYOS	CODIGO	AGUA DE BOMBEO (AB) M7: Sustrato hervido y recuperado solo el sobrenadante.	
		CONDICIONES	
		Diferentes	Similares
1	Control +B1(a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	Volumen de sustrato: 150 ml Agitación: 180 rpm Aireación: 0.25 vvm pH inicial: 7
1	Control +B2(a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	
1	Control +B3(a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	
1	Control +B4(a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	
1	Control +B1(b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	
1	Control +B2(b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	
1	Control +B3(b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	
1	Control +B4(b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	

Fuente: elaboración propia (2022).

ENSAYOS DE DESLIPIDIFICACIÓN PARA LA CEPA BL18-06			
N° ENSAYOS	CODIGO	AGUA DE BOMBEO (AB) M7: Sustrato hervido, recuperado solo el sobrenadante y se autoclavó solo para el control -.	
		CONDICIONES	
		Diferentes	Similares
1	Control -B1(a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	Volumen de sustrato: 150 ml
1	Control -B2(a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	Agitación: 180 rpm
1	Control -B3(a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	Aireación: 0.25 vvm
1	Control -B4(a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	pH inicial: 7
1	Control -B1(b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	
1	Control -B2(b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	
1	Control -B3(b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	
1	Control -B4(b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	

Fuente: elaboración propia (2022).

ENSAYOS DE DESLIPIDIFICACIÓN PARA LA CEPA BL18-06			
N° ENSAYOS	CODIGO	AGUA DE BOMBEO (AB) M7: Sustrato hervido y recuperado solo el sobrenadante.	
		CONDICIONES	
		Diferentes	Similares
1	BUZYME B1(a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	Volumen de sustrato: 150 ml
1	BUZYME B2(a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	Volumen de enzima: 1.12 ml
1	BUZYME B3(a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	Agitación: 180 rpm
1	BUZYME B4(a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	Aireación: 0.25 vvm
1	BUZYME B1(b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	pH inicial: 7
1	BUZYME B2(b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	
1	BUZYME B3(b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	
1	BUZYME B4(b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	

Fuente: elaboración propia (2022).

2. Diseño factorial 2² para los ensayos de desproteínización con la cepa BG18-03

BIOENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN CON LA CEPA BG18-03			
N° ENSAYOS	CODIGO	AGUA DE BOMBEO (AB) M1: Sustrato original sin ningún tratamiento.	
		CONDICIONES	
		Diferentes	Similares
1	B5 (a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	Volumen de sustrato: 150 ml
1	B6 (a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	Volumen de inóculo: 1.5 ml
1	B7 (a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	Agitación: 180 rpm
1	B8 (a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	Aireación: 0.25 vvm
1	B5 (b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	pH inicial: 7
1	B6 (b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	
1	B7 (b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	
1	B8 (b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	

Fuente: elaboración propia (2022).

BIOENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN CON LA CEPA BG18-03			
N° ENSAYOS	CODIGO	AGUA DE BOMBEO (AB) M1: Sustrato original sin ningún tratamiento.	
		CONDICIONES	
		Diferentes	Similares
1	Control B5(a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	Volumen de sustrato: 150 ml
1	Control B6(a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	Agitación: 180 rpm
1	Control B7(a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	Aireación: 0.25 vvm
1	Control B8(a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	pH inicial: 7
1	Control B5(b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	
1	Control B6(b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	
1	Control B7(b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	
1	Control B8(b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	

Fuente: elaboración propia (2022).

BIOENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN CON LA CEPA BG18-03			
N° ENSAYOS	CODIGO	AGUA DE BOMBEO (AB) M1: Sustrato original sin ningún tratamiento.	
		CONDICIONES	
		Diferentes	Similares
1	PROTAMEX B5(a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	Volumen de sustrato: 150 ml
1	PROTAMEX B6(a)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	Cantidad de enzima: 0.96 mg
1	PROTAMEX B7(a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	Agitación: 180 rpm
1	PROTAMEX B8(a)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	Aireación: 0.25 vvm
1	PROTAMEX B5(b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 8 horas	pH inicial: 7
1	PROTAMEX B6(b)	Temperatura: 20°C / Tiempo: 24 horas	
1	PROTAMEX B7(b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 8 horas	
1	PROTAMEX B8(b)	Temperatura: 35°C / Tiempo: 24 horas	

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 3

Tabla 17. Análisis de varianza, sobre la reducción de la materia orgánica (%DBO₅) de los bioensayos con respecto a sus controles.

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p	R ²	R ² aj
Bioensayos BG18-03	11	3045.04	276.822	53.70	0.000		
Error	12	61.85	5.154				
Total	23	3106.90				98.01	96.18

Fuente: elaboración propia (2022).

Tabla 18. Media de la reducción de la materia orgánica (%DBO₅) y desviación estándar de los bioensayos, con la cepa BG18-03.

Ensayos	Número de réplicas	Media del porcentaje de reducción de la DBO ₅	Desviación estándar	Intervalos de confianza (95% IC)
B5	2	61.43	4.62	(57.93; 64.93)
B6	2	74.5528	0.0988	(71.0550; 78.0506)
B7	2	54.5416	0.1383	(51.0438; 58.0395)
B8	2	69.117	1.344	(65.619; 72.615)
Control B5	2	50.03	2.13	(46.53; 53.53)
Control B6	2	70.68	3.91	(67.18; 74.18)
Control B7	2	59.28	2.92	(55.78; 62.78)
Control B8	2	76.6909	0.0791	(73.1931; 80.1887)
PROTAMEX B5	2	61.571	0.277	(58.073; 65.069)
PROTAMEX B6	2	65.414	0.257	(61.916; 68.911)
PROTAMEX B7	2	33.75	3.14	(30.25; 37.25)
PROTAMEX B8	2	64.617	0.435	(61.119; 68.115)

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 4

Tabla 20. Análisis de varianza, sobre el %DP de los bioensayos con respecto a sus controles.

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p	R ²	R ² aj
Bioensayos BG18-03	11	14858.4	1350.76	15979.34	0.000		
Error	12	1.0	0.08				
Total	23	14859.4				99.99	99.99

Fuente: elaboración propia (2022).

Tabla 21. Media de los %DP y desviación estándar de los bioensayos, con la cepa BG18-03

Bioensayos	Número de réplicas	Media de los %DP	Desviación estándar	Intervalos de confianza (95% IC)
B5	2	22.007	0.336	(21.559; 22.455)
B6	2	85.469	0.1392	(85.0210; 85.9169)
B7	2	40.125	0.301	(39.677; 40.573)
B8	2	93.1243	0.0508	(92.6763; 93.5722)
Control B5	2	14.248	0.271	(13.801; 14.696)
Control B6	2	14.342	0.214	(13.894; 14.790)
Control B7	2	25.493	0.347	(25.045; 25.941)
Control B8	2	24.586	0.369	(24.138; 25.034)
PROTAMEX B5	2	25.73	0.28	(25.282; 26.178)
PROTAMEX B6	2	37.168	0.575	(36.720; 37.616)
PROTAMEX B7	2	22.9931	0.0428	(22.5452; 23.4410)
PROTAMEX B8	2	44.5891	0.0456	(44.1412; 45.0370)

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 5

Tabla 23. Prueba no paramétrica de Mood para las comparaciones de los bioensayos con sus controles y enzimas para el %DL.

Bioensayos	Mediana	IC de la mediana de 95%
B5	77.5821	(76.0855; 79.0786)
B6	90.3746	(90.3319; 90.4174)
B7	84.6934	(84.6510; 84.7358)
B8	96.0299	(95.6922; 96.3677)
Control B5	78.1073	(77.8673; 78.3473)
Control B6	77.7772	(77.4635; 78.0909)
Control B7	81.7287	(80.6375; 82.8200)
Control B8	81.1108	(80.9507; 81.2710)
PROTAMEX B5	1.109	(0.838651; 1.37929)
PROTAMEX B6	1.5476	(1.20945; 1.88585)
PROTAMEX B7	3.2092	(3.19712; 3.22130)
PROTAMEX B8	3.1993	(3.07956; 3.31898)
Valor p	0.045	

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 6

Tabla 25. Análisis de varianza (ANOVA) de los efectos sobre la reducción de materia orgánica (%DBO₅ reducido), en el diseño.

Fuentes de variación	GL	SC	Efectos	VIF	Valor p	R ²	R ² aj
Modelo	3	460.576			0.004		
Temperatura (°C)	1	75.957	-6.163	1.00	0.022		
Tiempo (h)	1	383.563	13.849	1.00	0.002		
Temperatura (°C)*Tiempo (h)	1	1.056	0.727	1.00	0.692		
Error	4	23.220					
Total	7	483.796				95.20	91.60

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 7

Tabla 26. Análisis de varianza (ANOVA) de los efectos sobre el %DP, en el diseño factorial 2² de la cepa BG18-03.

Fuentes de variación	GL	SC	Efectos	FIV	Valor p	R ²	R ² aj
Modelo	3	7168.48			0.000		
Temperatura (°C)	1	332.12	12.8865	1.00	0.000		
Tiempo (h)	1	6781.62	58.2307	1.00	0.000		
Temperatura (°C)*Tiempo (h)	1	54.73	-5.2312	1.00	0.000		
Error	4	0.23					
Total	7	7168.7				100.00	99.99

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 8

Tabla 27. Análisis de varianza (ANOVA) de los efectos sobre el %DL, en el diseño factorial 2² de la cepa BG18-03.

Fuentes de variación	GL	SC	Efectos	VIF	Valor p	R ²	R ² aj
Modelo	3	373.661			0.000		
Temperatura (°C)	1	81.493	6.383	1.0	0.001		
Tiempo (h)	1	291.107	12.065	1.0	0.000		
Temperatura (°C)*Tiempo (h)	1	1.06	-0.728	1.0	0.397		
Error	4	4.715					
Total	7	378.376				98.75	97.82

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 9

Tabla N°28. Análisis de varianza, sobre la reducción de la materia orgánica (%DBO₅) de los bioensayos con respecto a sus controles.

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p	R ²	R ² aj
Bioensayos BL18-06	15	5362.99	357.533	141.76	0.000		
Error	16	40.35	2.522				
Total	31	5403.34				99.25	98.55

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 10

Tabla 29. Media de la reducción de la materia orgánica (%DBO₅) y desviación estándar de los bioensayos, con la cepa BL18-06.

Ensayos	Número de réplicas	Media del porcentaje de reducción de la DBO ₅	Desviación estándar	Intervalos de confianza (95% IC)
B1	2	40.827	0.706	(38.446; 43.207)
B2	2	44.57	2.27	(42.18; 46.95)
B3	2	35.83	1.56	(33.45; 38.21)
B4	2	58.23	3.32	(55.85; 60.62)
BUZYME B1	2	17.121	1.263	(14.740; 19.501)
BUZYME B2	2	21.995	1.006	(19.615; 24.376)
BUZYME B3	2	17.44	1.8	(15.06; 19.82)
BUZYME B4	2	16.818	1.006	(14.437; 19.199)
Control –B1	2	23.84	2.72	(21.46; 26.22)
Control –B2	2	38.374	1.349	(35.994; 40.755)
Control –B3	2	29.87	1.99	(27.49; 32.25)
Control –B4	2	43.915	0.921	(41.534; 46.295)
Control +B1	2	9.809	0.171	(7.429; 12.190)
Control +B2	2	14.896	0.257	(12.515; 17.276)
Control +B3	2	24.447	0.492	(22.067; 26.828)
Control +B4	2	28.323	0.193	(25.942; 30.703)

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 11

Tabla 31. Análisis de varianza, sobre el %DL en los bioensayos con respecto a sus controles.

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p	R ²	R ² aj
Bioensayos BL18-06	15	1091.35	72.7567	98.75	0.000		
Error	16	11.79	0.7367				
Total	31	1103.14				98.93	97.93

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 12

Tabla 32. Media de los %DL y desviación estándar de los bioensayos, con la cepa BL18-06.

Bioensayos	Número de réplicas	Media de los %DL	Desviación estándar	Intervalos de confianza (95% IC)
B1	2	80.4847	0.1351	(79.1981; 81.7714)
B2	2	89.207	0.458	(79.1981; 81.7714)
B3	2	89.880	0.892	(88.594; 91.167)
B4	2	93.026	1.296	(91.739; 94.312)
BUZYME B1	2	91.351	0.151	(90.064; 92.638)
BUZYME B2	2	95.315	0.147	(94.028; 96.602)
BUZYME B3	2	88.180	0.372	(86.893; 89.466)
BUZYME B4	2	93.290	0.964	(92.004; 94.577)
Control –B1	2	77.402	1.037	(76.115; 78.688)
Control –B2	2	77.090	0.595	(75.803; 78.376)
Control –B3	2	78.574	0.704	(77.287; 79.861)
Control –B4	2	78.6257	0.0570	(77.3391; 79.9124)
Control +B1	2	85.360	0.578	(84.073; 86.647)
Control +B2	2	86.20	1.84	(84.92; 87.49)
Control +B3	2	85.70	1.49	(84.41; 86.99)
Control +B4	2	88.012	0.329	(86.725; 89.298)

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 13

Tabla 34. Análisis de varianza, sobre el %DP de los bioensayos con respecto a sus controles.

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p	R ²	R ² aj
Bioensayos BL18-06	15	10491.0	699.399	3358.43	0.000		
Error	16	3.3	0.208				
Total	31	10494.3				99.97	99.94

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 14

Tabla 35. Media de los %DP y desviación estándar de los bioensayos, con la cepa BL18-06.

Bioensayos	Número de réplicas	Media de los %DP	Desviación estándar	Intervalos de confianza (95% IC)
B1	2	34.192	0.654	(33.508; 34.876)
B2	2	48.16	0.491	(47.476; 48.844)
B3	2	37.925	0.1008	(37.2409; 38.6091)
B4	2	62.086	0.518	(61.402; 62.770)
BUZYME B1	2	3.943	0.908	(3.259; 4.627)
BUZYME B2	2	3.521	0.935	(2.836; 4.205)
BUZYME B3	2	4.265	0.546	(3.581; 4.949)
BUZYME B4	2	3.924	0.281	(3.240; 4.608)
Control –B1	2	5.718	0.32	(5.034; 6.402)
Control –B2	2	3.9738	0.1173	(3.2898; 4.6579)
Control –B3	2	3.936	0.368	(3.252; 4.620)
Control –B4	2	4.0556	0.0695	(3.3716; 4.7397)
Control +B1	2	24.1921	0.0625	(23.5081; 24.8762)
Control +B2	2	25.2706	0.0989	(24.5865; 25.9546)
Control +B3	2	20.503	0.2	(19.819; 21.188)
Control +B4	2	30.2675	0.0296	(29.5834; 30.9515)

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 15

Tabla N°38. Análisis de varianza de los efectos sobre la DBO₅, en el diseño factorial 2² de la cepa BL18-06.

Fuentes de variación	GL	SC	Efecto	VIF	Valor p	R ²	R ² aj
Modelo	3	553.53			0.002		
Temperatura (°C)	1	37.62	4.337	1.00	0.048		
Tiempo (h)	1	341.73	13.071	1.00	0.001		
Temperatura (°C)*Tiempo (h)	1	174.19	9.332	1.00	0.004		
Error	4	19.10					
Total	7	572.63				96.66	94.16

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 16

Tabla N°39. Análisis de varianza de los efectos sobre el %DL, en el diseño factorial 2² de la cepa BL18-06.

Fuentes de variación	GL	SC	Efectos	VIF	Valor p	R ²	R ² aj
Modelo	3	173..280			0.000		
Temperatura (°C)	1	87.304	6.607	1.00	0.000		
Tiempo (h)	1	70.425	5.934	1.00	0.001		
Temperatura (°C)*Tiempo (h)	1	15.552	-2.789	1.00	0.009		
Error	4	2.703					
Total	7	175.983				98.46	97.31

Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 17

Tabla N°40. Análisis de varianza de los efectos sobre el %DP, en el diseño factorial 2² con la cepa BL18-06.

Fuentes de variación	GL	SC	Efectos	VIF	Valor p	R ²	R ² aj
Modelo	3	7168.48			0.000		
Temperatura (°C)	1	332.12	12.8865	1.00	0.000		
Tiempo (h)	1	6781.62	58.2307	1.00	0.000		
Temperatura (°C)*Tiempo (h)	1	54.73	-5.2312	1.00	0.000		
Error	4	0.23					
Total	7	7168.7				100.00	99.99

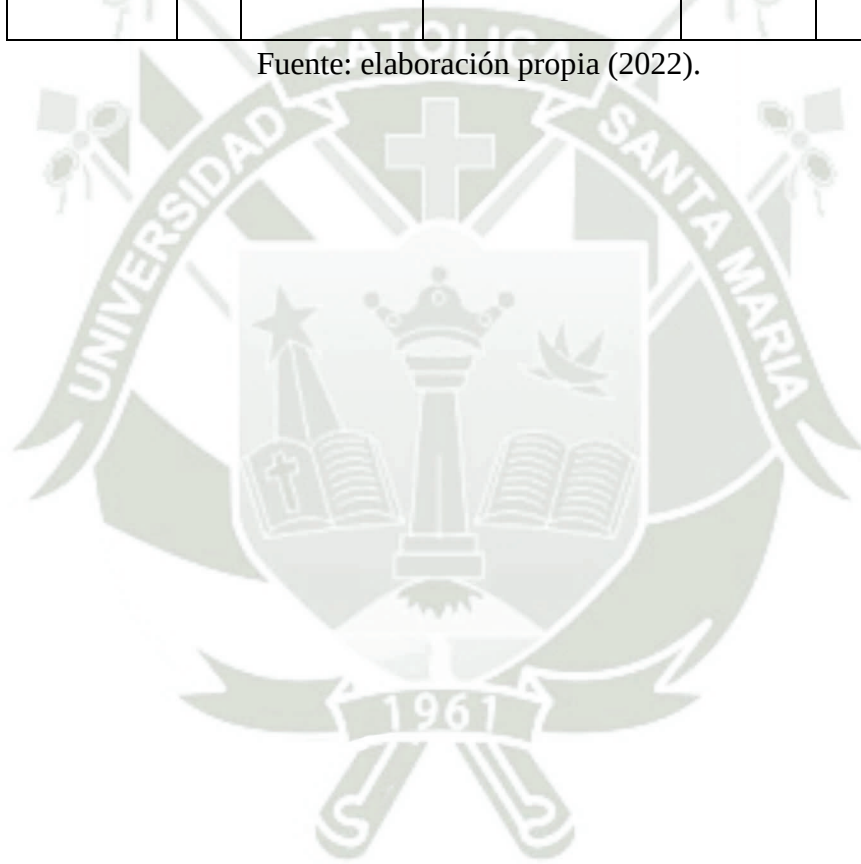
Fuente: elaboración propia (2022).

Anexo 18

Tabla N°41. Desviación estándar de los bioensayos de la reducción de materia orgánica (%DBO₅) con las cepas BG18-03 y BL18.06.

Cepa	N	Desv. Est.	IC	R ²	R ² _{aj}
BG18-03	2	1.344	(61.422; 76.818)		
BL18-06	2	3.32	(50.54; 65.93)		
				90.25	85.37

Fuente: elaboración propia (2022).

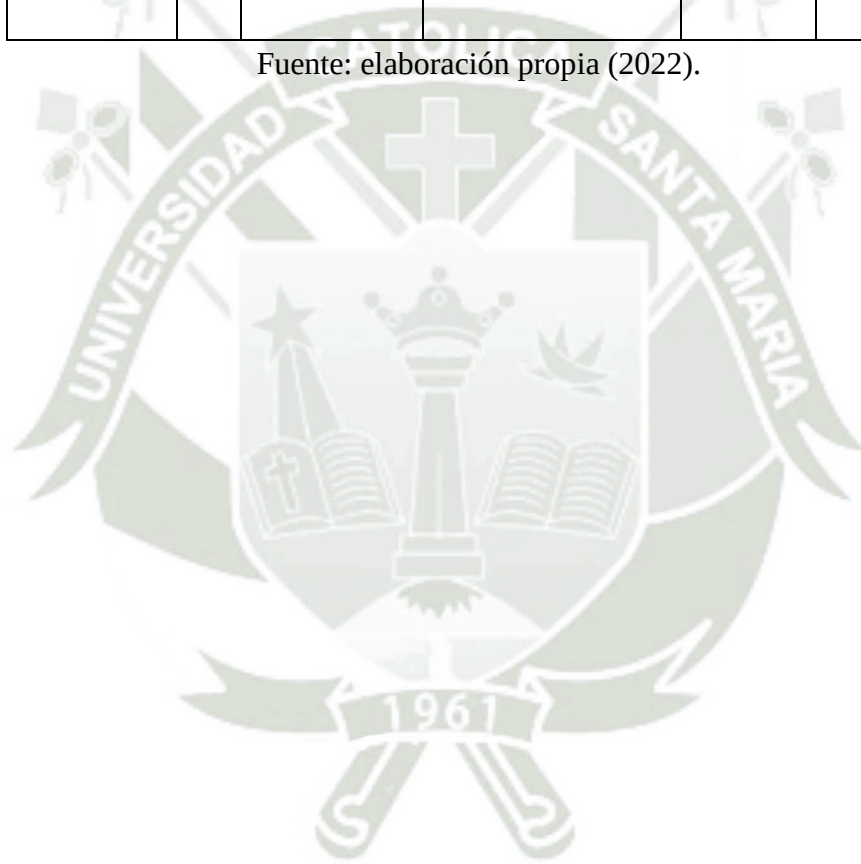


Anexo 19

Tabla N°42. Desviación estándar de los bioensayos del %DL con las cepas BG18-03 y BL18-06.

Cepa	N	Desv. Est.	IC	R ²	R ² aj
BG18-03	2	0.478	(93.058; 99.001)		
BL18-06	2	1.296	(90.054; 95.997)		
				82.55	73.83

Fuente: elaboración propia (2022).



Anexo 20

Tabla N°45. Desviación estándar de los bioensayos del %DP con las cepas BG18-03 y BL18.06.

Cepa	N	Desv. Est.	IC	R ²	R ² _{aj}
BG18-03	2	0.0508	(92.0050; 94.2435)		
BL18-06	2	1.518	(60.967; 63.206)		
				99.97	99.96

Fuente: elaboración propia (2022).

