

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

*“Estudio comparativo de actividad lipolítica en cepas
bacterianas mesófilas y antárticas para biorremediación de grasas”*

VIDA-412

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Bióloga

Presentado por:

Melany Denisse Tumbaco Torres

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

El presente proyecto se lo dedico
a mis padres y perritas Roxana, Roberto,
Candy y Lucero por ser sabiduría,
refugio, amor y apoyo incondicional. A
mis abuelos por ser cariño y confianza
absolutos. A mis amigas Estefi, Dani y
todas por ser luz, alegría y de los más
grandes presentes que la carrera me
ofreció. A mis profesores y mentores por
ser guía y aliento en este viaje. Y a mis
artistas y autores favorita/os, cuyas
canciones y letras fueron compañía,
entendimiento y motivación invaluable.
Los tengo siempre en el corazón.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible este proyecto con su apoyo y confianza. Al Laboratorio de Proteómica, a mi tutora, la PhD Nardy del Valle Diez, al futuro Biólogo y amigo Michael Choez, a las biólogas Nicole López y Marisa Arias, por su apoyo y paciencia, y al Ing. Jeffrey Vargas. Extiendo también mi gratitud al CIBE y a la ESPOL por brindarme sus instalaciones y recursos, permitiéndome crecer profesionalmente y avanzar en el camino hacia mis metas.

Declaración Expresa

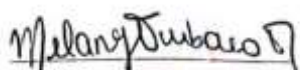
Yo **Melany Denisse Tumbaco Torres** reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 20 de mayo del 2025.



Melany Denisse Tumbaco Torres

Evaluadores

Nombre del Profesor

Nardy Del Valle Diez Garcia

Nombre del Profesor

Diego Arturo Gallardo Polit

RESUMEN

La acumulación de grasas y aceites en sistemas de drenaje genera obstrucciones y contaminación ambiental, por lo que se requieren alternativas sostenibles para su degradación. Este estudio tiene como objetivo comparar el potencial lipolítico de cepas y consorcios bacterianos mesófilos aislados de trampas de grasa urbanas con bacterias antárticas psicrófilas optimizadas para biorremediación, bajo la hipótesis de que la sinergia microbiana incrementa la actividad degradativa. Se aislaron y activaron cepas bacterianas, realizándose pruebas cualitativas con rodamina B y titulaciones ácido-base para cuantificar la actividad lipolítica. Posteriormente, se evaluó la compatibilidad entre cepas mediante ensayos de antagonismo y se formuló un consorcio bacteriano (relación 1:1:1), el cual fue probado en medio LB con aceite de oliva. Los resultados mostraron que el consorcio mesófilo presentó mayor actividad lipolítica que las cepas individuales, superando incluso a las bacterias antárticas inoculadas bajo sus condiciones óptimas. Por ello, se concluye que la combinación de cepas nativas con alta afinidad por sustratos grasos representa una estrategia prometedora para la biorremediación de residuos oleosos, con potencial de aplicación en entornos reales.

Palabras clave: bacterias lipolíticas, consorcio microbiano, biorremediación.

Abstract

The accumulation of fats and oils in drainage systems leads to obstructions and environmental pollution, making sustainable alternatives for their degradation necessary. This study aims to compare the lipolytic potential of mesophilic bacterial strains and consortia isolated from urban grease traps with psychrophilic Antarctic bacteria optimized for bioremediation, under the hypothesis that microbial synergy enhances degradative activity. Bacterial strains were isolated and activated, followed by qualitative assays with rhodamine B and acid–base titrations to quantify lipolytic activity. Subsequently, strain compatibility was evaluated through antagonism tests, and a bacterial consortium (1:1:1 ratio) was formulated and tested in LB medium supplemented with olive oil. The results showed that the mesophilic consortium exhibited higher lipolytic activity than individual strains, even surpassing Antarctic bacteria inoculated under their optimal conditions. Therefore, it is concluded that combining native strains with high affinity for lipid substrates represents a promising strategy for the bioremediation of oily wastes, with strong potential for application in real-world environments.

Keywords: lipolytic bacteria, microbial consortium, bioremediation.

Índice General

Resumen.....	I
<i>Abstract</i>	II
Capítulo 1	I
1.1 Introducción	II
1.2 Descripción del Problema	III
1.3 Justificación del Problema	IV
1.4 Objetivos.....	V
<i>1.4.1 Objetivo general</i>	V
<i>1.4.2 Objetivos específicos</i>	VI
1.5.3 Influencia de factores ambientales en la actividad enzimática y adaptaciones fisiológicas de bacterias mesófilas y extremófilas	VIII
Capítulo 2.....	11
2. Metodología.	12
2.1 Origen de las cepas bacterianas y recolección de muestras	12
2.2 Aislamiento y activación de cepas bacterianas	13
2.3 Caracterización de las cepas bacterianas.....	14
2.4 Evaluación cualitativa de actividad lipolítica.....	15
2.5 Obtención del extracto enzimático	16
2.6 Titulación de la actividad lipolítica	17
2.7 Cálculo de la actividad lipolítica	19
2.8 Formación del consorcio bacteriano a partir de cepas mesófilas	20
Capítulo 3	22

3.1 Actividad lipolítica en cepas bacterianas	23
Capítulo 4.....	33
4.1 Conclusiones y recomendaciones	34
4.1.2 Recomendaciones.....	35

Abreviaturas

ACU Aceite de Cocina Usado

AN Agar Nutritivo

CA Consorcio Antártico

CIBE Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador

CTG Consorcio Trampa de Grasa (mesófilo)

ESPOL Escuela Superior Politécnica del Litoral

LB Luria-Bertani (medio de cultivo bacteriano)

NaCl Cloruro de Sodio

NaOH Hidróxido de Sodio

OD Densidad Óptica (Optical Density)

ODS Objetivos de Desarrollo Sostenible

pH Potencial de Hidrógeno

rpm Revoluciones por Minuto

TSA Tryptic Soy Agar

TG Trampa de Grasa (ejemplo: TG3, TG5, TG16)

UV Ultravioleta

Simbología

°C Grados Celsius (temperatura)

g Gramo

h Hora

L Litro

mL Mililitro

mmol Milimol

μL Microlitro

μmol Micromol

nm Nanómetro

pH Potencial de Hidrógeno

U/mL Unidades de actividad enzimática por mililitro

Índice de figuras

Fig 2.1 1 Morfología de cepas Antártidas.....	14
Figura 3.1 1. Fenotipo de microorganismos seleccionados de la trampa de grasa	25
Figura 3.2 1. Box Plot: Comparación de la actividad lipolítica entre cepas	28
Figura 3.3 1. Comparación de la actividad lipolítica de consorcios mesófilos vs antárticos mediante pruebas no paramétricas.....	29
Figura 3.4 1. Análisis de correspondencia: Consorcios vs cepas individuales	31

Índice de tablas

Tabla 3.1 1. Actividad lipolítica de los microorganismos de la trampa de grasa con sus respectivas repeticiones	24
Tabla 3.2 1. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallisy Test de Tukey para comparar actividad lipolítica entre cepas.....	24
Tabla 3.3 1. Actividad lipolítica de los microorganismos de la Antártida con sus respectivas repeticiones	26

Capítulo 1

1.1 Introducción

La disposición inadecuada del aceite de cocina usado (ACU) representa una amenaza ambiental silenciosa pero persistente a nivel global. Según datos obtenidos por la OECD , se estima que cada año se generan alrededor de 42 millones de toneladas de este residuo, producto del uso intensivo de aceites vegetales en hogares e industrias alimentarias. Este incremento está directamente relacionado con la acelerada urbanización, el crecimiento demográfico y el aumento de la demanda en el sector gastronómico, lo que conlleva a una mayor producción de residuos grasos (Foo et al., 2021).

Cuando el ACU es vertido sin tratamiento previo en sistemas de alcantarillado o cuerpos de agua, sus efectos se multiplican. Este residuo, debido a su baja biodegradabilidad y alta viscosidad se adhiere a las paredes internas de las tuberías. Causando obstrucciones en el flujo de agua, desbordamientos y daños en las plantas de tratamiento, generando sobrecostos en mantenimiento y reparaciones. Por otro lado, en cuerpos de agua, el aceite forma una película superficial que interfiere con el intercambio de oxígeno, alterando el equilibrio ecosistémico y acelerando procesos como la eutrofización, afectando la biodiversidad y la calidad del recurso hídrico.

En el contexto ecuatoriano, esta problemática es evidente. Un estudio realizado en la ciudad de Puyo reveló que más del 23% de los locales gastronómicos vierten directamente el ACU en el sistema de alcantarillado, mientras que otro 27% lo desecha junto con la basura común. Esta mala gestión contribuye a la contaminación de suelos, aguas superficiales y subterráneas, especialmente en zonas cercanas a ríos como el Pastaza. Aún más preocupante es que el 89,4% de los responsables de estos establecimientos no poseen conocimiento real sobre los efectos contaminantes del ACU (Prieto-Guerrero et al., 2022) .

Ante esta situación, en ciertos restaurantes se han implementado estructuras como las trampas de grasa, que permiten la retención de residuos lipídicos antes de su descarga al sistema sanitario. Sin embargo, su efectividad depende de un mantenimiento adecuado y de un manejo posterior del material acumulado (Peng et al., 2021). De ahí que, en los últimos años, se haya incrementado el interés por el uso de bacterias con actividad lipolítica como solución biotecnológica complementaria o alternativa.

Entre estas destacan las bacterias mesófilas, cuyo crecimiento óptimo se sitúa entre los 20 °C y 45 °C. Estas son comunes en ambientes urbanos y tropicales, y participan en múltiples procesos metabólicos gracias a su versatilidad fisiológica (Biomining, 2014). A su vez, las bacterias extremófilas, como las aisladas de ambientes antárticos, destacan por su resistencia a condiciones extremas de temperatura o pH y por su capacidad de producir enzimas funcionales bajo dichos entornos (Choo et al., 1998). Esta diversidad fisiológica permite considerar a ambos tipos de bacterias como agentes potenciales en estrategias de biorremediación sostenibles, tanto en contextos urbanos como en sistemas naturales vulnerables.

1.2 Descripción del Problema

En ambientes urbanos, la acumulación de residuos grasos representa una fuente persistente de contaminación orgánica con efectos observables tanto en los ecosistemas naturales como en estructuras sanitarias. Cuando estos compuestos se liberan al entorno sin tratamiento, pueden formar biofilm, alterando el equilibrio microbiano y afectando la calidad del agua junto con la biodiversidad acuática. Al mismo tiempo, su persistencia y resistencia a la degradación natural los convierte en un reto para los sistemas de tratamiento residual convencionales, lo que genera la

necesidad de soluciones eficientes, específicas y sostenibles (Adetunji & Olaniran, 2021).

Entre los compuestos involucrados, los triglicéridos constituyen una fracción relevante. Su descomposición requiere procesos catalíticos especializados, donde las lipasas de origen microbiano han demostrado ser herramientas versátiles. Estas enzimas no solo catalizan la hidrólisis de triglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol, sino que también permiten reacciones de interés como esterificación y transesterificación, incluso en condiciones ambientales poco controladas (Choo et al., 1998). Su estabilidad frente a variaciones de pH, temperatura, y su capacidad de producción masiva las han posicionado como biocatalizadores clave en procesos industriales y ambientales.

Sin embargo, la eficacia de estas enzimas depende en gran medida del origen y naturaleza del microorganismo productor. Diversas cepas bacterianas, aisladas de entornos contrastantes, como zonas templadas o polares, muestran diferencias notables en su rendimiento lipolítico, lo que abre el camino a investigaciones comparativas (Kovacic et al., 2019). En ese marco, la identificación de cepas con alta eficiencia catalítica y estabilidad en condiciones reales se vuelve fundamental para el desarrollo de estrategias biotecnológicas aplicables en la gestión de residuos lipídicos.

1.3 Justificación del Problema

La acumulación y mala gestión de residuos grasos representa una amenaza concreta para la sostenibilidad ambiental y la eficiencia de los sistemas de saneamiento. Resolver este problema no solo responde a una necesidad técnica, sino también a una responsabilidad ecológica y social urgente. La creciente presión sobre

los ecosistemas acuáticos, derivada del vertido de aceites y grasas, demanda soluciones que integren el conocimiento biológico con la innovación tecnológica.

En este contexto, las enzimas lipasas de origen microbiano se presentan como herramientas clave en procesos de biorremediación. Su capacidad para catalizar la degradación de aceites en condiciones variables, junto con su estabilidad y especificidad, las convierte en aliadas estratégicas para reducir la carga contaminante (Gupta et al., 2004). Además, su producción a partir de bacterias aisladas de diferentes ambientes permite explorar soluciones adaptadas a contextos locales, aumentando la viabilidad de su implementación a escala.

Paralelamente, esta evaluación aporta datos valiosos, generando conocimiento transferible y con impacto directo en la mejora de sistemas de gestión ambiental. Alienándose con los Objetivos de Desarrollo Sostenible, en especial con el ODS 6 (agua limpia y saneamiento), el ODS 14 (vida submarina) y el ODS 9 (industria, innovación e infraestructura), al promover tecnologías limpias, proteger los ecosistemas acuáticos y fortalecer la capacidad técnica en el tratamiento de contaminantes orgánicos (Naciones Unidas, 2018).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Evaluar la capacidad degradativa de grasas en microorganismos mesófilos y antárticos, a través de pruebas de actividad lipolítica, para la valoración de su aplicabilidad en estrategias de biorremediación.

1.4.2 Objetivos específicos

- Estimular la producción de enzimas lipasas en cepas bacterianas mesófilas y antárticas, mediante su cultivo en medios con sustratos adecuados, para la activación de su respectiva capacidad lipolítica.
- Cuantificar la actividad lipolítica de las diferentes cepas, por medio del análisis de ácidos grasos liberados como indicador de degradación lipídica, con el fin de determinar su potencial como microorganismos biotecnológicos.
- Comparar las diferencias en los niveles de actividad lipolítica entre las distintas cepas, bajo condiciones controladas, para la identificación del grupo con mayor potencial biorremediador.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Características de bacterias con actividad lipolítica

Las bacterias lipolíticas se distinguen por su capacidad para producir enzimas que degradan compuestos grasos, especialmente los triglicéridos. Estas moléculas, formadas por una unidad de glicerol unida a tres ácidos grasos mediante enlaces éster, son comunes en aceites vegetales, grasas animales y otros residuos oleosos. Las lipasas producidas por estas bacterias catalizan la hidrólisis de estos enlaces, liberando glicerol y ácidos grasos libres, transformando compuestos complejos en formas más simples y asimilables, lo que resulta fundamental en contextos de remediación ambiental (Gupta et al., 2004).

Por otro lado, estas bacterias proliferan de forma natural en ambientes ricos en lípidos debido a que estos compuestos sirven como fuente de carbono y energía. Cuando un ambiente presenta una carga elevada de grasas, como ocurre en suelos contaminados con aceite, aguas residuales domésticas, lodos industriales o trampas de grasa, se crea una presión selectiva que favorece el desarrollo de comunidades microbianas capaces de metabolizar estos residuos. Por lo que la presencia constante de lípidos en estos entornos actúa como un

estímulo ecológico, permitiendo que este tipo de bacterias se establezcan, se adapten y dominen el nicho microbiano (Kumar et al., 2012).

Uno de los entornos más relevantes para el aislamiento de estas bacterias, por las razones anteriormente mencionadas, son las trampas de grasa, dispositivos instalados en sistemas de drenaje para capturar aceites y grasas antes de que entren al alcantarillado. Estas estructuras, si bien están diseñadas como barreras físicas, terminan generando un microambiente ideal para el crecimiento de bacterias lipolíticas, ya que concentran compuestos que estas bacterias pueden descomponer (Tang et al., 2024).

A su vez, dentro de los géneros bacterianos con mayor actividad lipolítica se encuentran *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Burkholderia* y *Rhodococcus*. Estas especies no solo toleran condiciones variables de temperatura, pH y salinidad, sino que también presentan adaptaciones que les permiten secretar lipasas de forma extracelular, facilitando su recolección para uso en procesos industriales. Además, muchas de ellas exhiben una alta estabilidad catalítica incluso en presencia de solventes orgánicos o en medios poco convencionales, lo que amplía su aplicabilidad (Kovacic et al., 2019).

Por último, además de su capacidad para degradar lípidos, varias bacterias lipolíticas han demostrado potencial para actuar sobre hidrocarburos, especialmente aquellos presentes en derrames de petróleo o residuos industriales. Esta versatilidad se debe a la similitud estructural entre los compuestos grasos y los hidrocarburos, ya que ambos son hidrofóbicos y ricos en carbono. Por ello, estas bacterias no solo representan una alternativa eficiente en el tratamiento de residuos alimentarios, sino que también podrían emplearse en estrategias de biorremediación más amplias orientadas a la recuperación de ecosistemas contaminados (Patowary et al., 2016)

1.5.2 Propiedades bioquímicas de las lipasas

Las lipasas son enzimas hidrolíticas (EC 3.1.1.3) que catalizan la ruptura de enlaces éster presentes en triglicéridos, liberando ácidos grasos libres y glicerol. Este proceso es esencial para la degradación de compuestos lipídicos complejos, como los aceites vegetales y grasas animales. Lo particular de estas enzimas es que no actúan en el interior del aceite o en el agua por separado, sino justo donde ambos se encuentran: en la interfase, es decir, en la superficie que se forma cuando un líquido oleoso flota sobre el agua. Allí, las lipasas se posicionan estratégicamente para acceder a los triglicéridos sin necesidad de que estos se disuelvan completamente (Gupta et al., 2004). Simultáneamente, al actuar en ese límite entre fases, inician la hidrólisis, rompiendo los enlaces éster y generando productos como ácidos grasos libres y glicerol. Estos compuestos, al ser más solubles, pueden difundirse fácilmente en el medio acuoso y ser aprovechados metabólicamente por las bacterias productoras, lo que completa el ciclo de degradación eficiente (Adetunji & Olaniran, 2021).

Además, estas enzimas participan en reacciones como la transesterificación, mediante la cual un triglicérido reacciona con un alcohol (como metanol) para formar ésteres de ácidos grasos y glicerol, un paso clave en la producción de biodiésel a partir de residuos grasos (Chandra et al., 2020).

1.5.3 Influencia de factores ambientales en la actividad enzimática y adaptaciones fisiológicas de bacterias mesófilas y extremófilas

La actividad de las lipasas microbianas está fuertemente determinada por las condiciones del entorno. Factores como el pH, la temperatura, la concentración de sustrato y el tiempo de incubación influyen directamente en la velocidad de la reacción enzimática, así como en la estabilidad y funcionalidad de la enzima

producida. Por lo que entender cómo estos parámetros afectan el comportamiento catalítico de las lipasas es esencial, tanto para optimizar procesos de degradación, como para seleccionar adecuadamente cepas bacterianas con potencial biotecnológico adaptadas a diferentes ambientes (Tong et al., 2023).

En primer lugar, el pH del medio regula la carga eléctrica de los residuos presentes en el sitio activo de la enzima. La mayoría de las lipasas microbianas presentan una actividad óptima en rangos de pH neutro a ligeramente alcalino (pH 6–9), aunque algunas pueden funcionar en condiciones más extremas. Cambios significativos en este parámetro pueden desestabilizar la estructura tridimensional de la enzima y afectar su capacidad catalítica (Ali et al., 2023).

La temperatura también es un factor crucial. Cada enzima tiene un rango de temperatura óptimo en el cual alcanza su máxima eficiencia. Las lipasas mesofílicas suelen operar entre 30 °C y 45 °C, mientras que las de bacterias extremófilas pueden mantener su actividad a temperaturas mucho más bajas, incluso cercanas a 0 °C. Sin embargo, estas últimas tienden a desnaturalizarse más fácilmente a temperaturas elevadas debido a su mayor flexibilidad estructural (Ali et al., 2023)

Asimismo, la concentración de sustrato influye en la velocidad inicial de reacción: a mayor disponibilidad de lípidos, la actividad aumenta hasta alcanzar un punto de saturación, más allá del cual ya no se incrementa la tasa de reacción. Este efecto está directamente relacionado con la afinidad de la enzima por su sustrato, un valor que varía según la cepa y su ambiente de origen (Gupta et al., 2004). Por otro lado, el tiempo de incubación es clave para permitir que el proceso de degradación avance lo suficiente sin que ocurran procesos de inhibición por acumulación de productos o desnaturalización enzimática (Tong et al., 2023).

Dado que estos parámetros afectan de forma distinta a cada cepa bacteriana, es fundamental comparar el comportamiento de microorganismos aislados de diferentes entornos, como es el caso de bacterias mesófilas provenientes de trampas de grasa urbanas y bacterias psicrófilas aisladas de ambientes antárticos. Esta comparación permite evaluar no solo la eficiencia de degradación lipídica, sino también la adaptabilidad de las enzimas a condiciones ambientales diversas.

Las bacterias mesófilas están adaptadas a temperaturas moderadas, propias de climas tropicales y urbanos. Sus lipasas suelen ser más rígidas en su estructura, lo que les proporciona estabilidad térmica, aunque suelen perder actividad fuera de sus condiciones óptimas (Gupta et al., 2004). En cambio, las bacterias extremófilas producen lipasas con estructuras más flexibles, capaces de funcionar a bajas temperaturas con menor requerimiento energético. Esta flexibilidad estructural permite que la enzima mantenga su actividad catalítica incluso en ambientes fríos, aunque a costa de una menor estabilidad térmica (Zhang et al., 2018).

Esto, principalmente porque presentan una menor cantidad de enlaces no covalentes fuertes, como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, lo que hace que su estructura tridimensional sea más flexible y dinámica. Esta característica favorece la movilidad del sitio activo y permite que la catálisis ocurra eficientemente a bajas temperaturas, donde las enzimas más rígidas no podrían funcionar. Sin embargo, esta misma falta de rigidez estructural también las hace más susceptibles a la desnaturalización cuando la temperatura aumenta, lo que limita su estabilidad en condiciones térmicas elevadas (Feller & Gerday, 2003).

Capítulo 2

2. Metodología.

2.1 Origen de las cepas bacterianas y recolección de muestras

El presente estudio empleó cepas bacterianas de dos orígenes contrastantes: ambientes antárticos extremos y ambientes urbanos con alta carga lipídica. Esta selección se justificó por el interés en comparar la actividad lipolítica de bacterias adaptadas a condiciones climáticas severas con aquellas provenientes de zonas urbanas tropicales, como modelo para aplicaciones en biorremediación de residuos grasos.

Las cepas A16.7 y A24.6 (**Fig 2.1 1**) fueron seleccionadas a partir de una colección de once microorganismos recolectados durante la XXVI Expedición Antártica Ecuatoriana, realizada en enero de 2023. Las muestras originales correspondieron a material orgánico ubicado en los suelos de la Isla Rey Jorge. Estos aislamientos fueron realizados en condiciones de bioseguridad nivel 1 y posteriormente cultivados y preservados en medios adecuados hasta su uso experimental. Además, la selección específica de estas dos cepas se basó en resultados previos que evidenciaron mayor actividad lipolítica comparativa.

Por otra parte, las cepas bacterianas mesófilas fueron aisladas a partir de muestras recolectadas en una trampa de grasa instalada en el sistema de drenaje de un comedor universitario. La muestra fue extraída cuidadosamente desde la capa superficial líquida con un frasco de vidrio estéril de tapa hermética, recolectando un volumen aproximado de 400 mL. El transporte se realizó en una hielera, y las muestras fueron procesadas dentro de las primeras cuatro horas para preservar la viabilidad microbiana.

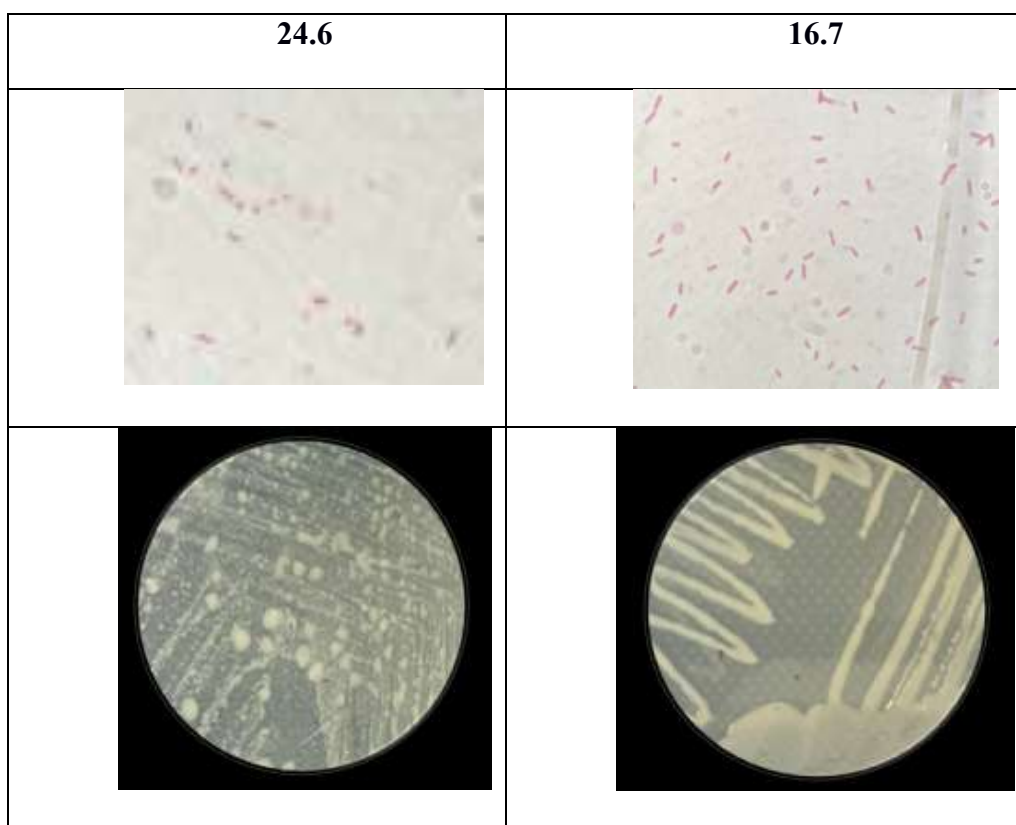
2.2 Aislamiento y activación de cepas bacterianas

Una vez que las muestras de la trampa de grasa llegaron al laboratorio, se procedió a su preparación inicial mediante diluciones seriadas utilizando agua peptonada estéril, alcanzando una dilución final de 10^{-7} . Esta técnica tuvo como propósito reducir la concentración microbiana y facilitar el aislamiento de colonias individuales. A partir de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} se tomaron alícuotas de 100 μ L y se inocularon sobre placas con medio sólido TSA (*Tryptic Soy Agar*), aplicando el método de Rígalski, el cual consiste en una siembra por extensión con asa estéril, asegurando una distribución homogénea de las células sobre la superficie del medio.

Luego, las placas fueron incubadas a 28 °C durante 48 horas y finalizado este periodo, se observó que la dilución 10^{-5} presentó una mayor diversidad de morfotipos coloniales. En base a características fenotípicas como forma, margen, color, textura y elevación, se seleccionaron ocho colonias distintas que fueron consideradas de interés para los siguientes ensayos. Estas colonias fueron posteriormente aisladas mediante siembra por estría en medio AN (Agar Nutritivo), incubándolas a 28 °C durante 72 horas.

Paralelamente, las cepas antárticas A16.7 y A24.6 fueron reactivadas a partir de sus respectivos preservados criogénicos, los cuales se encontraban almacenados a -80 °C en solución de LB (Luria-Bertani) con glicerol estéril. Cada preservado fue descongelado y sembrado por estría con asa circular en medio AN. Las placas fueron incubadas también a 16 °C durante tres días, tratando de incentivar el crecimiento bacteriano sin alterar sus propiedades fisiológicas.

Fig 2.1 2 Morfología de cepas Antártidas



NOTA: TORRES, N. L. (2023). FENOTIPO DE MICROORGANISMOS DE LA ANTÁRTIDA. *DEGRADACIÓN DE GRASAS POR ACCIÓN DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE LA ANTÁRTIDA Y DE UN CONSORCIO BACILLUS SPP.* ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL, GUAYAQUIL, ECUADOR. OBTENIDO DE [HTTPS://DSPACE.ESPOL.EDU.EC/HANDLE/123456789/58383](https://dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/58383)

2.3 Caracterización de las cepas bacterianas

Con el fin de complementar la caracterización fenotípica de las cepas bacterianas seleccionadas, se llevó a cabo la tinción de Gram, una técnica diferencial ampliamente utilizada para clasificar microorganismos en función de la estructura de su pared celular. Este método permitió distinguir entre bacterias Gram positivas, caracterizadas por una pared gruesa de peptidoglicano que retuvo el colorante cristal violeta, y bacterias Gram negativas, cuya pared delgada y membrana externa

facilitaron la pérdida del colorante primario, adquiriendo posteriormente la coloración rosada del contraste (Madigan et al., 2019)

El procedimiento se desarrolló extendiendo una porción del cultivo bacteriano sobre un portaobjetos estéril, fijando el frotis mediante calor y aplicando sucesivamente los reactivos correspondientes: cristal violeta, lugol como mordiente, etanol como agente decolorante y safranina como colorante de contraste. Finalmente, las muestras fueron observadas bajo microscopía óptica con objetivo de inmersión (100X), registrando la respuesta a los tintes de cada cepa, así como características morfológicas como forma, tamaño y tipo de agrupación celular.

2.4 Evaluación cualitativa de actividad lipolítica

Posteriormente, se inició la evaluación preliminar de la actividad lipolítica, la cual se llevó a cabo mediante un ensayo cualitativo en medio líquido suplementado con rodamina B, adaptado del protocolo descrito por Furini (2018). Esta prueba tuvo como finalidad identificar de manera visual y rápida la producción extracelular de enzimas lipasas por parte de las cepas bacterianas, siendo una herramienta básica y exploratoria dentro del proceso de selección microbiana.

El medio se preparó utilizando 1 mL de caldo LB auto clavado por cada pocillo, a los cuales se les añadió posteriormente 5 μ L de aceite de oliva estéril, empleado como sustrato lipídico. A esta mezcla, también se le incorporó una concentración definida de rodamina B, un colorante fluorescente que permite la detección indirecta de la actividad enzimática a través de su interacción con los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis (Stemler et al., 2024).

Seguidamente, la inoculación se realizó en las mismas placas de 24 pocillos, distribuyendo las bacterias con el fin de tener triplicados para cada cepa a evaluar. A

su vez, las placas se incubaron a 28 °C durante 72 horas, y la fluorescencia fue observada bajo luz ultravioleta ($\lambda = 350$ nm) para identificar la presencia de actividad lipolítica, la cual era visible como zonas difusas de coloración naranja brillante en el medio. Ante esto, tres cepas demostraron tener potencial de actividad y se las catalogó como TG3, TG5 y TG16 al presentar una fluorescencia intensa y consistente en los tres replicados.

Por otro lado, cabe resaltar que, junto con las cepas mesófilas provenientes de la trampa de grasa, también fueron evaluadas en esta etapa las cepas antárticas A16.7 y A24.6, con el objetivo de confirmar si conservaban su capacidad lipolítica bajo estas condiciones experimentales generales. Ambas cepas demostraron una fluorescencia compatible con la actividad esperada, lo que respaldó su continuidad en el diseño experimental.

2.5 Obtención del extracto enzimático

Una vez seleccionadas las cepas de interés, se procedió al cultivo en medio líquido para inducir la producción de enzimas lipolíticas extracelulares. Las bacterias mesófilas TG3, TG5 y TG16 fueron cultivadas en 100mL de medio Luria Bertani suplementado con 4mL de aceite de oliva estéril, el cual fue agregado después de la esterilización del medio para evitar su degradación térmica y problemas de homogenización, teniendo un pH final de 7.2. De igual manera, se incubaron los respectivos controles que consistían en medio LB sin inocular y medio LB+aceite de oliva sin exposición a las bacterias. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 96 horas a 28 °C, con agitación constante a 150 rpm en un Shaking incubator (HYSC).

Por otro lado, las cepas antárticas A16.7 y A24.6 fueron cultivadas en condiciones previamente optimizadas para favorecer su expresión enzimática. La cepa

A16.7 fue inoculada e incubada a un pH de 3.18 y temperatura de 23.7 °C, mientras que las condiciones de A24.6 fueron pH de 6.67 y temperatura de 25.5 °C, demostrando ser psicrotolerantes. Ambos cultivos también se mantuvieron en agitación continua durante 96 horas a 150 rpm junto a sus respectivos controles negativos, los cuales tenían los mismos parámetros.

Cabe resaltar que cada cepa fue trabajada por triplicado independiente, considerando que son 5 cultivos diferentes, asegurando la repetibilidad de los resultados. Y finalizado el periodo de incubación, los cultivos líquidos (tanto bacterianos como controles) fueron transferidos y sometidos a centrifugación a 6500 rpm durante 20 minutos a 4 °C, utilizando una centrífuga modelo 5810 R (Eppendorf). El objetivo de este paso fue separar la biomasa bacteriana del sobrenadante, donde se encuentra la enzima secretada o lipasas extracelulares. El sobrenadante fue cuidadosamente recolectado en tubos estériles, tratando de descartar la capa superficial de aceite y evitando el arrastre del pellet. Luego fue almacenado a 4 °C para su uso inmediato en los ensayos de cuantificación.

2.6 Titulación de la actividad lipolítica

La actividad de las enzimas lipasas producidas por las cepas seleccionadas se cuantificó mediante un ensayo de titulación ácido-base, adaptado del protocolo propuesto por Al Mohaini et al. (2022). Este procedimiento permitió estimar indirectamente la cantidad de ácidos grasos liberados como producto de la hidrólisis de triglicéridos presentes en el sustrato.

Para tal efecto, se preparó una emulsión estable que sirvió como sustrato enzimático, compuesta por un 10% de aceite de oliva, 10% p/v de goma arábiga (como agente emulsionante), 0.6% de cloruro de calcio (CaCl_2) y 10% de buffer

fosfato de sodio 0.1 M. El volumen restante se completó con agua destilada estéril, y para cada reacción, se mezclaron 2.25 mL de esta emulsión con 0.25 mL del sobrenadante enzimático crudo previamente obtenido.

Luego, las mezclas fueron incubadas en agitación constante a 150 rpm durante 1 hora a 28 °C, utilizando agitadores orbitales modelo Innova 40 (New Brunswick Scientific) y Shaking Incubator HYSC. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se interrumpió la reacción enzimática mediante la adición de 3.75 mL de una solución acetona: etanol en proporción 1:1 (v/v). Este paso permitió detener la actividad catalítica de la lipasa. A continuación, se añadió 22.5 µL de fenolftaleína al 1% como indicador de pH. Y seguidamente, se procedió a la titulación directa con NaOH 0.05 M, utilizando una bureta manual, hasta observar el cambio a una coloración rosa tenue, indicativo del punto final de neutralización (Al Mohaini et al., 2022).

El volumen de hidróxido de sodio consumido durante la titulación fue registrado para cada muestra. Este dato permitió comparar de manera relativa la intensidad de la actividad lipolítica entre cepas, partiendo del principio de que una mayor liberación de ácidos grasos requiere mayor cantidad de base para ser neutralizada.

Las titulaciones se realizaron por triplicado para cada una de las cinco cepas evaluadas junto a sus respectivos controles, asegurando consistencia y reproducibilidad en los resultados.

Similarmente, para el futuro cálculo de la actividad lipolítica y para asegurar la validez de los resultados obtenidos en la titulación, se prepararon blancos específicos por cada cepa y condición de control experimental. Estos blancos fueron tratados bajo el mismo protocolo de incubación, agitación y temperatura que las muestras experimentales, con la única diferencia de que el sobrenadante enzimático se

añadió únicamente después de interrumpida la reacción con la solución de acetona: etanol. Esta modificación permitió descartar cualquier neutralización generada por compuestos no lipolíticos presentes en el medio o en el sustrato, asegurando que el consumo de NaOH se atribuyera exclusivamente a la acción catalítica de las enzimas lipasas.

Por último, cabe mencionar que al realizar las titulaciones todas las mezclas fueron homogenizadas utilizando un agitador magnético modelo Color Squid (IKA Works), lo cual facilitó la visibilidad del punto final y mejoró la precisión en la adición de la solución base.

2.7 Cálculo de la actividad lipolítica

Para cuantificar la actividad lipolítica de los extractos enzimáticos crudos obtenidos de las cepas bacterianas, se empleó una fórmula volumétrica que estima la cantidad de ácidos grasos liberados durante la hidrólisis de triglicéridos. Esta metodología se basa en la diferencia entre el volumen de base fuerte (NaOH) requerido para titular los productos generados por la acción enzimática y el volumen necesario en los blancos. De esta forma, se obtiene un valor corregido que refleja exclusivamente la acción de la lipasa presente en la muestra (Al Mohaini et al., 2022).

La ecuación utilizada fue:

$$\text{Actividad lipolítica} = \frac{(V_S - V_B) \times N \times 1000}{S} \quad (0.1)$$

donde V_S representa el volumen (en mL) de NaOH consumido para titular la muestra con actividad enzimática, V_B corresponde al volumen requerido para el

blanco sin actividad lipasa, N es la normalidad del NaOH (0.05 M) y S es el volumen total del sustrato emulsificador utilizado en cada reacción. El resultado se expresa en unidades de actividad por mililitro (U/mL), donde una unidad (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de ácidos grasos por minuto bajo condiciones estandarizadas (Al Mohaini et al., 2022).

2.8 Formación del consorcio bacteriano a partir de cepas mesófilas

Con el propósito de evaluar el potencial sinérgico de las cepas TG3, TG5 y TG16, previamente seleccionadas por su actividad lipolítica, se procedió a la preparación de un consorcio microbiano. Inicialmente, para obtener un crecimiento rápido y masivo, cada cepa fue cultivada de forma individual en 150 mL de caldo nutritivo (Nutrient Broth) en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Estos a su vez, fueron incubados durante siete días a 28 °C y 170 rpm en un agitador orbital, para promover un crecimiento adecuado (Patowary et al., 2016).

Una vez finalizada la incubación, se ajustó la densidad celular de cada cultivo a una absorbancia de 1.0 a 600 nm (OD_{600}), mediante mediciones en un espectrofotómetro y utilizando microplacas de 96 pocillos, con 200 μ L por pocillo en triplicado. En caso de que la OD fuera superior a 1.0, se realizaron diluciones con solución salina estéril (NaCl al 0.09%). En cambio, si la OD fue inferior, se concentró la biomasa por centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, descartando de manera controlada microlitros o mililitros del sobrenadante y resuspendiendo el pellet en menor volumen hasta alcanzar el valor deseado (Patowary et al., 2016).

Después, cada cultivo se sometió a centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue cuidadosamente descartado sin perturbar el pellet bacteriano y los pellets celulares obtenidos se lavaron dos veces con solución salina estéril (NaCl al 0.85%) para eliminar residuos del medio.

En cada lavado, los pellets fueron sometido a agitación suave con micropipeta o vortex, seguido de una nueva centrifugación a las mismas condiciones. Tras el segundo lavado, los pellets se resuspendieron en solución salina estéril y se ajustó la densidad celular para los 3 a una absorbancia de 0.35 a 590 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. (Wijerathna et al., 2024).

Por último, se mezclaron volúmenes iguales en relación 1:1:1 para conformar el consorcio bacteriano. El cual posteriormente fue utilizado para inocular medio LB con aceite de oliva respetando los parámetros establecidos anteriormente de 28°C a 150 rpm por 5 días, incorporando un 5% (v/v) del consorcio preparado respecto al volumen total del medio (Patowary et al., 2016). Y de esta forma se dio paso al proceso de titulación para obtener datos cuantitativos de actividad lipolítica, repitiendo este procedimiento con las dos bacterias de la Antártida, considerando sus respectivos parámetros de temperatura y pH optimizados, los cuales fueron previamente mencionados en las secciones 2.5 y 2.6.

Capítulo 3

3.1 Actividad lipolítica en cepas bacterianas

Los ensayos de actividad lipasa incluyeron controles negativos con valores de 0 U/mL, lo que confirmó que el consumo de la base titulada se debió exclusivamente a la liberación de ácidos grasos por acción enzimática y no a reacciones químicas inespecíficas. Este resultado se alinea con protocolos estándar de determinación titulométrica de lipasas, que emplean emulsiones de aceite de oliva estabilizadas con goma arábiga y, en muchos casos, con CaCl_2 , garantizando que los controles sin enzima no produzcan cambios de pH (Stoytcheva et al., 2012). El uso de aceite de oliva como sustrato, rico en ácido oleico (55–83%) y con proporciones menores de palmítico, linoleico y esteárico, resulta especialmente relevante, pues proporciona un perfil lipídico bien caracterizado frente al cual muchas lipasas muestran especificidad (Hernández et al., 2021). En este contexto, la unidad utilizada (U/mL) corresponde a la liberación de 1 μmol de ácido graso por minuto, lo que facilita la comparación con otros estudios.

3.1.1 Desempeño de las cepas mesófilas

La morfología de las cepas provenientes de la trampa de grasa (TG5, TG3 y TG16) se observa en la **Fig. 3.1.1**, mientras que su actividad lipolítica está resumida en la **Tabla 3.1.1**. De acuerdo con la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis, se detectaron diferencias significativas entre las cepas evaluadas ($H = 11,74$; $p = 0,0153$, **Tabla 3.2.1**).

El análisis de rangos promedios y la asignación de letras de significancia (**Tabla 3.2.1**) muestran que TG5 obtuvo el valor más alto (14,0), seguido de TG16 y TG3, mientras que las cepas antárticas se ubicaron en los valores más bajos. A su vez, no se detectaron diferencias estadísticamente claras entre TG5, TG16 y TG3, aunque los valores absolutos de TG5 fueron consistentemente mayores.

Tabla 3.1 1. Actividad lipolítica de los microorganismos de la trampa de grasa con sus respectivas repeticiones

Muestra	Rep 1 (U/ml)	Rep 2 (U/ml)	Rep 3 (U/ml)	Rep 4 (U/ml)	Rep 5 (U/ml)	Promedio
TG5	9	8	8	8	8	8,2
TG3	6	6	4	4	4	4,8
TG16	6	6	7	7	7	6,6

Tabla 3.2 1. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallisy Test de Tukey para comparar actividad lipolítica entre cepas

Variable	MUESTRA	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio	rangos	n	p
ACT. ENZ.	A16.7	3	3,33	1,15	4,00	4,33	11,74	0,0153	
ACT. ENZ.	A24.6	3	2,67	1,15	2,00	3,17			
ACT. ENZ.	TG16	3	6,33	0,58	6,00	10,33			
ACT. ENZ.	TG3	3	5,33	1,15	6,00	8,17			
ACT. ENZ.	TG5	3	8,33	0,58	8,00	14,00			

Trat.	Ranks
A24.6	3,17 A
A16.7	4,33 A B
TG3	8,17 A B C
TG16	10,33 B C
TG5	14,00 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

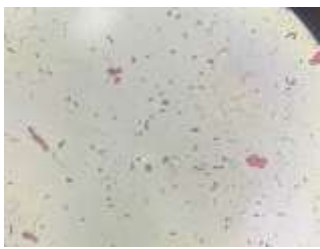
Estos resultados, también sugieren que aunque las bacterias provenientes de la trampa de grasa no se separan de forma concluyente entre sí, TG5 resalta como la cepa mesófila de mayor potencial degradador, respaldando la idea de que probablemente sus lipasas poseen una mayor eficiencia catalítica frente a triglicéridos ricos en oleato. Asimismo, la actividad intermedia de TG16 con valores estables entre réplicas, refleja la posibilidad de un sistema de secreción enzimática consistente y robusto. En contraste, TG3 se ubica en un punto intermedio con mayor variabilidad, lo que podría estar asociado a una menor afinidad hacia triglicéridos dominados por oleato o a una mayor susceptibilidad a la inhibición por ácidos grasos libres acumulados durante el ensayo.

Por lo tanto, resulta fundamental destacar que la calidad de la emulsión utilizada en los ensayos es clave al momento de realizar la experimentación. Esto,

debido a que el mecanismo de activación interfacial de las lipasas se relaciona directamente con la apertura de un dominio estructural denominado *tapa* o *lid*, el cual se desplaza al entrar en contacto con una superficie hidrofóbica. Esta transición expone el sitio catalítico y permite que la enzima adquiera su conformación activa. En este contexto, emulsiones con gotas más pequeñas y homogéneas incrementan la superficie interfacial disponible, lo que a su vez favorece que un mayor número de enzimas se encuentren simultáneamente en estado activo, aumentando la eficiencia global del sistema (Rehm et al., 2010).

En el presente estudio, la incorporación de goma arábica como emulsificante natural fue clave, ya que esta sustancia recubre las gotas de aceite y evita su coalescencia, manteniendo estable la dispersión del sustrato en el medio acuoso. A esto se suma la acción del CaCl_2 , que no solo aporta estabilidad electrostática a la emulsión, sino que también cumple una función estructural en ciertas lipasas, al facilitar la conformación catalíticamente activa del dominio *lid*. La combinación de estos factores permite que los resultados obtenidos fueran consistentes entre réplicas y que la magnitud de la actividad enzimática registrada refleje de manera confiable la capacidad de hidrólisis de las cepas evaluadas (Rehm et al., 2010).

Figura 3.1 1. Fenotipo de microorganismos seleccionados de la trampa de grasa

TG5	TG3	TG16
		



Nota. Las fotos superiores pertenecen a la visualización microscópica con objetivo 100X de las tinciones de Gram realizadas; y las fotos inferiores corresponden a la siembra de las bacterias mesófilas en medio agar nutritivo.

3.1.2 Desempeño de las cepas psicrofílas

Tabla 3.3.1. Actividad lipolítica de los microorganismos de la Antártida con sus respectivas repeticiones

Muestra	Rep 1 (U/ml)	Rep 2 (U/ml)	Rep 3 (U/ml)	Rep 4 (U/ml)	Rep 5 (U/ml)	Promedio
A16.7	4	4	2	2	2	2,8
A24.6	2	2	4	4	4	3,2

Las cepas antárticas A16.7 y A24.6, identificadas molecularmente como *Serratia marcescens*, presentaron niveles de actividad lipolítica relativamente bajos en comparación con las cepas mesófilas (**Tabla 3.3.1; Figura 3.2.1**). Este comportamiento se explica por la naturaleza de sus enzimas psicrofílas, que poseen una estructura altamente flexible para mantener su función catalítica en condiciones de bajas temperaturas. Si bien esta flexibilidad permite un buen desempeño en el ambiente antártico, también compromete su estabilidad y eficiencia catalítica en condiciones más templadas, lo que limita la hidrólisis de triglicéridos en los ensayos realizados fuera de su rango óptimo de adaptación (Choo et al., 1998).

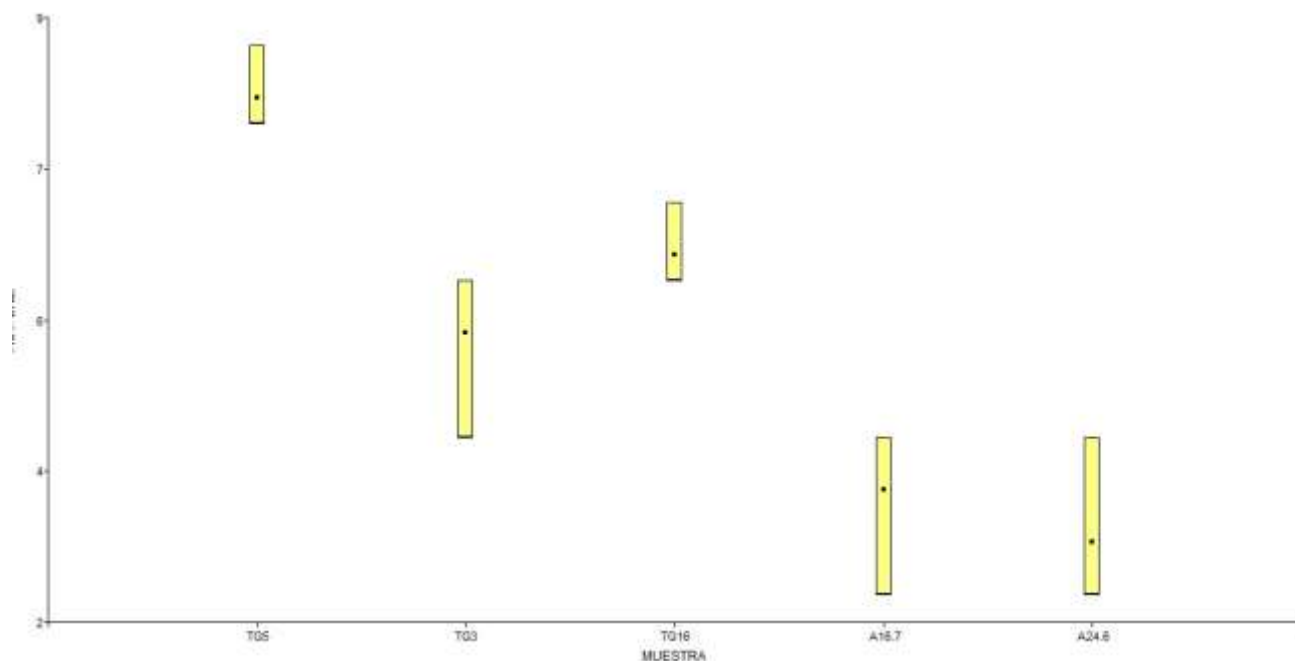
Un aspecto relevante es que, aun tratándose de la misma especie bacteriana, ambas cepas mostraron diferencias en la morfología de las colonias cultivadas (**Fig. 2.1.1**) y en su respuesta funcional. La variación en coloración y textura entre A16.7 y

A24.6 refleja la microdiversidad intraespecífica propia de *S. marcescens*, sustentada en la existencia de un pangenoma abierto en el que genes accesorios, sistemas de regulación o características de superficie celular pueden modular tanto el fenotipo colonial como la capacidad metabólica. Esto explica por qué, pese a compartir un núcleo genético común, estas cepas exhiben perfiles fisiológicos diferenciados (Abreo & Altier, 2019).

En cuanto a los resultados cuantitativos, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, A16.7 alcanzó una actividad promedio de 3,33 U/mL, ligeramente superior a los 2,67 U/mL registrados en A24.6. Este contraste resulta llamativo al considerar el origen ambiental de cada aislamiento. La cepa A24.6 provino de un área con alta concentración de materia orgánica derivada de excretas de pingüinos, rica en nutrientes y lípidos de origen animal. En este tipo de ambientes, la abundancia de sustratos suele ir acompañada de metabolitos secundarios potencialmente inhibitorios, como ácidos grasos libres o compuestos nitrogenados, que ejercen presión selectiva hacia cepas capaces de tolerar condiciones de sobrecarga orgánica. Así, es posible que A24.6 haya privilegiado mecanismos de resistencia y

regulación frente a la saturación de nutrientes, más que la producción intensiva de lipasas (Ding et al., 2015).

Figura 3.2 1. Box Plot: Comparación de la actividad lipolítica entre cepas



Por el contrario, A16.7 se aisló de un suelo con musgos y menor carga orgánica, aunque todavía significativa. En este tipo de entornos, los recursos son más limitados o se presentan en formas más complejas, por lo que las bacterias deben optimizar su repertorio enzimático para aprovechar eficientemente incluso pequeñas cantidades de compuestos disponibles. Esta presión selectiva podría haber favorecido en A16.7 una estrategia de mayor producción relativa de lipasas o de enzimas más versátiles, lo que explicaría su actividad ligeramente superior frente a A24.6, pese a provenir de un ambiente con menor aporte lipídico directo (Ding et al., 2015).

3.1.1 Efecto de los consorcios microbianos

El análisis de los resultados de actividad lipolítica obtenidos para los consorcios microbianos revela diferencias notorias entre el desempeño de las

comunidades bacterianas mesófilas y antárticas. En promedio, el consorcio mesófilo alcanzó una actividad enzimática de 13,5 U/mL, mientras que el psicrófilo registró 5,67 U/mL. Este comportamiento se refuerza con el análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis, que evidenció diferencias altamente significativas ($H=17,28$; $p<0,0001$) entre ambos grupos, confirmando que el consorcio mesófilo presentó una actividad consistentemente superior (**Fig 3.3.1**). Desde un punto de vista cuantitativo, el consorcio mesófilo superó en un 65 % a su mejor cepa individual (TG5 con 9 U/mL), mientras que el psicrófilo lo hizo en un 77 % respecto a su mejor aislado (A24.6 con 4 U/mL). Estos resultados indican que, aunque ambos consorcios mostraron un efecto positivo frente a las cepas aisladas, la magnitud del aumento en la actividad depende fuertemente de la naturaleza de las bacterias que los conforman y de su adaptación a las condiciones de cultivo.

Figura 3.3 1. Comparación de la actividad lipolítica de consorcios mesófilos vs antárticos mediante pruebas no paramétricas



La diferencia entre ambos consorcios puede explicarse a través de factores fisiológicos y evolutivos. Las bacterias mesófilas, aisladas de trampas de grasa en ambientes urbanos, han evolucionado bajo una presión selectiva constante de alta carga lipídica y condiciones cercanas a la neutralidad térmica, lo que favorece una elevada capacidad de producción de lipasas activas en entornos semejantes al

laboratorio (pH neutro, 23 °C). Por el contrario, las bacterias antárticas se caracterizan por ser psicrófilas y tener enzimas adaptadas a bajas temperaturas; al ser reactivadas repetidamente desde 2023, podrían haber perdido parte de su viabilidad y actividad, ya sea por acumulación de estrés en los ciclos de preservación y reactivación o por la inadecuada adaptación a las condiciones experimentales utilizadas, que aunque previamente validadas como óptimas, no necesariamente reflejan con fidelidad el rango fisiológico de estas cepas en su hábitat natural. Esto sugiere que la menor respuesta de las bacterias antárticas no necesariamente refleja un bajo potencial biotecnológico, sino una desventaja experimental en las condiciones evaluadas.

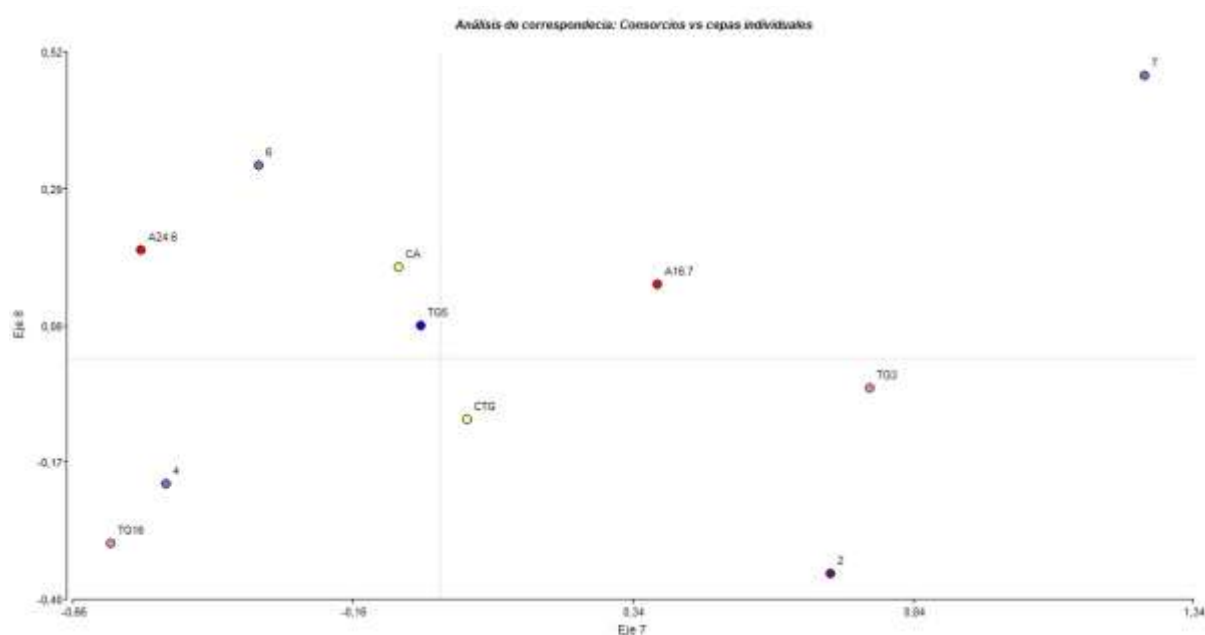
El comportamiento de los consorcios, que no supera la suma aritmética de las actividades individuales, apunta a que el efecto observado no es aditivo, sino que puede cumplir posiblemente el concepto sinérgico relativo.

Esta probable sinergia se explica a través de fenómenos de cooperación metabólica como el cross-feeding, en el cual una cepa puede secretar isoenzimas con distinta afinidad por los triglicéridos o consumir subproductos como ácidos grasos libres o glicerol que, en exceso, se convierten en inhibidores. De este modo, la interacción metabólica entre cepas permite mantener la reacción más eficiente y sostenida en el tiempo. En el caso del consorcio mesófilo, esta cooperación se tradujo en una actividad lipolítica significativamente mayor, lo que refuerza su aplicabilidad en entornos de alta carga de grasas, como aguas residuales de origen urbano o industrial (Ponomarova & Patil, 2015).

La pertinencia de utilizar consorcios bacterianos se ve respaldada también en el análisis de correspondencia (**Fig 3.4.1**), que mostró una clara separación entre los consorcios y las cepas individuales en los ejes de diferenciación. El consorcio mesófilo (CTG) se ubicó en un espacio independiente respecto a las bacterias

individuales, indicando un perfil metabólico distintivo y más robusto, mientras que el consorcio antártico (CA) mostró mayor cercanía con cepas individuales como TG5 y A16.7, lo que podría reflejar una menor diferenciación metabólica comunitaria y, en consecuencia, una menor ventaja comparativa. Estos patrones confirman que la estrategia de consorcio no solo incrementa la actividad enzimática, sino que además podría estar diversificando los perfiles metabólicos.

Figura 3.4 1. Análisis de correspondencia: Consorcios vs cepas individuales



Desde la perspectiva biotecnológica, los resultados evidencian que los consorcios bacterianos constituyen una herramienta viable para el desarrollo de soluciones de biorremediación en ambientes contaminados con grasas. El hecho de que el consorcio mesófilo supere significativamente a sus cepas individuales refuerza la idea de que, en entornos con condiciones favorables a su metabolismo, estos grupos microbianos pueden convertirse en sistemas altamente eficientes. Por otra parte, aunque el consorcio antártico mostró menor desempeño, su capacidad de incrementar la actividad respecto a los aislados individuales demuestra que, con ajustes de

temperatura, pH y posiblemente suplementación de nutrientes, podría potenciarse su rendimiento. Esto lo convierte en un candidato interesante para el diseño de estrategias de remediación en ambientes fríos o con fluctuaciones térmicas, donde los mesófilos perderían eficiencia.

En términos prácticos, la aplicación de estos consorcios podría traducirse en el diseño de bioaumentadores o inoculantes microbianos para sistemas de tratamiento de aguas residuales o trampas de grasa industriales. El consorcio mesófilo sería especialmente útil en plantas de tratamiento convencionales, mientras que el psicrófilo podría tener relevancia en regiones frías, aunque se requiere optimización.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

- A partir de la inducción de la actividad lipasa en cepas bacterianas mesófilas y antárticas, se determinó que todas expresaron actividad enzimática bajo condiciones de cultivo específicas. Sin embargo, las cepas mesófilas mostraron una mayor estabilidad y consistencia en comparación con las cepas antárticas.
- De acuerdo con las titulaciones de actividad lipolítica, se estableció que la cepa TG5 presentó el mayor potencial degradador (8,2 U/mL), mientras que entre las bacterias antárticas la cepa A16.7 obtuvo la actividad promedio más alta (2,8 U/mL). Estos resultados demuestran que las bacterias de trampa de grasa poseen una capacidad catalítica superior frente a los aislados polares.
- Al comparar la actividad lipolítica entre cepas individuales y consorcios bacterianos, se concluyó que el consorcio mesófilo (TG3, TG5 y TG16) alcanzó un valor de 13,5 U/mL, superando tanto a sus cepas individuales como al consorcio antártico (5,67 U/mL). Esto evidencia que la interacción microbiana favorece un efecto sinérgico en la degradación de lípidos.
- Se confirmó que la estrategia de consorcio resulta más eficiente para una potencial biorremediación, siendo el consorcio mesófilo el que mejor capacidad degradativa demostró. Superando significativamente tanto a la mejor cepa individual (TG5) como al consorcio antártico.
- En correspondencia con el objetivo general, se concluye que, aunque tanto los microorganismos mesófilos como los antárticos presentan actividad lipolítica, los consorcios mesófilos representan una alternativa más prometedora para la biorremediación de residuos oleosos en condiciones ambientales reales, mientras que los antárticos constituyen candidatos potenciales para estudios en ambientes fríos que requieran optimización de parámetros de cultivo.

4.1.2 Recomendaciones

Tras culminar lo planificado en la presente propuesta, se plantean las siguientes recomendaciones primordiales orientadas a expandir los alcances del estudio y fortalecer futuras investigaciones:

- Se sugiere explorar el uso de otros sustratos lipídicos, como grasas animales y aceites residuales industriales, en futuros ensayos, con el propósito de determinar la versatilidad y alcance de los consorcios bacterianos frente a distintos tipos de contaminantes presentes en entornos reales.
- Con el objetivo de ampliar el conocimiento de los mecanismos de degradación, se recomienda llevar a cabo análisis moleculares y enzimáticos que permitan identificar los genes y proteínas responsables de la actividad lipolítica en las cepas de mayor rendimiento, lo que facilitaría su caracterización y posible optimización biotecnológica en fases posteriores.
- Una de las principales limitaciones fue que el estudio se realizó en condiciones controladas de laboratorio, lo que no refleja por completo la complejidad de los ambientes reales donde se acumulan grasas (aguas residuales, trampas de grasa industriales). Para superar esta limitación, en una fase posterior se recomienda realizar ensayos piloto en sistemas reales o simulados, que permitan evaluar la eficacia de los consorcios en presencia de variaciones de pH, temperatura y carga orgánica.
- Otra limitación fue el alcance temporal de los experimentos, enfocados en periodos cortos de incubación. Esto impide conocer la estabilidad de la actividad lipolítica a largo plazo. En una fase futura debería considerarse el seguimiento prolongado de los consorcios bacterianos, con pruebas de persistencia en sistemas de tratamiento continuo.

- En el caso de las bacterias antárticas, la limitación principal fue que fueron evaluadas en condiciones de laboratorio adaptadas, pero no idénticas a su entorno natural. Esto puede haber reducido su desempeño enzimático. En fases posteriores se sugiere simular condiciones de bajas temperaturas y fluctuaciones ambientales, o incluso retomar pruebas en colaboración con programas de investigación polar, para validar su verdadero potencial.
- Finalmente, el estudio se centró en la actividad lipolítica general, sin profundizar en la caracterización molecular de las enzimas. Como fase complementaria, se recomienda realizar análisis genómicos y proteómicos, que permitan identificar las rutas metabólicas implicadas y abrir posibilidades de optimización biotecnológica.

Referencias

- Abreo, E., & Altier, N. (2019). Pangenome of *Serratia marcescens* strains from nosocomial and environmental origins reveals different populations and the links between them. *Scientific Reports*, 9(1), 46. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37118-0>
- Adetunji, A. I., & Olaniran, A. O. (2021). Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3), 1257-1269. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00503-5>
- Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., & Lee, I.-J. (2023). The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. *Microorganisms*, 11(2), 510. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020510>
- Biomining: Theory, microbes and industrial processes*. (2014). Springer.
- Centre for Water Quality and Algae Research, Department of Zoology, Faculty of Applied Sciences, University of Sri Jayewardenepura, Gangodawila, Nugegoda 10250, Sri Lanka, Wijerathna, P. A. K. C., Udayagee, K. P. P., Department of Bio-Systems Technology, Faculty of Technology, University of Sri Jayewardenepura, Gangodawila, Nugegoda 10250, Sri Lanka, Idroos, F. S., Centre for Water Quality and Algae Research, Department of Zoology, Faculty of Applied Sciences, University of Sri Jayewardenepura, Gangodawila, Nugegoda 10250, Sri Lanka, Manage, P. M., & Centre for Water Quality and Algae Research, Department of Zoology, Faculty of Applied Sciences, University of Sri Jayewardenepura, Gangodawila, Nugegoda 10250, Sri Lanka. (2024). Formulation of Novel Microbial Consortia for Rapid Composting of Biodegradable Municipal Solid Waste: An Approach in the Circular Economy. *Environment and Natural Resources Journal*, 22(3), 1-18. <https://doi.org/10.32526/enrj/22/20230270>

- Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 169.
<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
- Choo, D.-W., Kurihara, T., Suzuki, T., Soda, K., & Esaki, N. (1998). A Cold-Adapted Lipase of an Alaskan Psychrotroph, *Pseudomonas* sp. Strain B11-1: Gene Cloning and Enzyme Purification and Characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 486-491. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.486-491.1998>
- DING Wei, WANG Qing, ZHU Renbin & MA Dawei (2015). Distribution patterns of typical enzyme activities in tundra soils on the Fildes Peninsula of maritime Antarctica[J].
ADVANCES IN POLAR SCIENCE, <https://library.arcticportal.org/2556/1/A20150105.pdf>
- Feller, G., & Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, 1(3), 200-208. <https://doi.org/10.1038/nrmicro773>
- Foo, W. H., Chia, W. Y., Tang, D. Y. Y., Koay, S. S. N., Lim, S. S., & Chew, K. W. (2021). The conundrum of waste cooking oil: Transforming hazard into energy. *Journal of Hazardous Materials*, 417, 126129. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126129>
- Furini, G., Berger, J. S., Campos, J. A. M., Sand, S. T. V. D., & Germani, J. C. (2018). Production of lipolytic enzymes by bacteria isolated from biological effluent treatment systems. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(3), 2955-2965.
<https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170952>
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763-781. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8>
- Kovacic, F., Babic, N., Krauss, U., & Jaeger, K.-E. (2019). Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria. En F. Rojo (Ed.), *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils*

and Lipids (pp. 1-35). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_39-1

Kumar, S., Mathur, A., Singh, V., Nandy, S., Khare, S. K., & Negi, S. (2012).

Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. *Bioresource Technology*, 120, 300-304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.018>

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., Stahl, D. A., & Brock, T. D. (2019). *Brock biology of microorganisms* (Fifteenth edition, global edition). Pearson.

Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2016). Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from Contaminated Sites. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01092>

Peng, D., Cheng, S., Li, H., & Guo, X. (2021). Effective multi-functional biosorbent derived from corn stalk pith for dyes and oils removal. *Chemosphere*, 272, 129963. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129963>

Ponomarova, O., & Patil, K. R. (2015). Metabolic interactions in microbial communities: Untangling the Gordian knot. *Current Opinion in Microbiology*, 27, 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.06.014>

Prieto-Guerrero, M. E., Robalino-Zambrano, D. A., Sarduy-Pereira, L. B., Villavicencio-Montoya, J. F., & Diéguez Santana, K. (2022). Evaluación de estrategias de gestión de aceites de cocina usados. Caso de estudio Puyo, Amazonia Ecuatoriana. *Revista EIA*, 19(38). <https://doi.org/10.24050/reia.v19i38.1545>

Rehm, S., Trodler, P., & Pleiss, J. (2010). Solvent-induced lid opening in lipases: A molecular dynamics study. *Protein Science*, 19(11), 2122-2130. <https://doi.org/10.1002/pro.493>

- Stemler, C. D., Lorenz, K. K., & Scherf, K. A. (2024). Rhodamine B-based lipase activity assay with natural substrates—Development and application. *International Journal of Food Science & Technology*, 59(2), 1063-1070. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16875>
- Tang, L. Y., Wong, N. H., Chieng, T. A., Kiu, A. K. J., Choo, C. S., Li, Y., Tan, C. P., Yaser, A. Z., Khaerudini, D. S., Chen, G. H., & Sunarso, J. (2024). Physicochemical characteristics of grease-trap wastewater with different potential mechanisms of FOG solid formation, separation, and accumulation inside grease traps. *Water Research*, 256, 121607. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121607>
- Tong, Y., Li, Y., Qin, W., Wu, S., Xu, W., Jin, P., & Zheng, Z. (2023). New insight into the metabolic mechanism of a novel lipid-utilizing and denitrifying bacterium capable of simultaneous removal of nitrogen and grease through transcriptome analysis. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1258003. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1258003>
- Zhang, Y., Ji, F., Wang, J., Pu, Z., Jiang, B., & Bao, Y. (2018). Purification and characterization of a novel organic solvent-tolerant and cold-adapted lipase from *Psychrobacter* sp. ZY124. *Extremophiles*, 22(2), 287-300. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-0997-8>