

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Potencial Biotecnológico de Consorcios Microbianos Antárticos para la Biorremediación
de Materia Orgánica.

VIDA-424

Proyecto Integrador

Previo a la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Jimmy Michael Chóez Domínguez

Guayaquil – Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador por permitirme realizar este proyecto en conjunto con el laboratorio de proteómica. Al Instituto Oceanográfico y Antártico de la Armada por extender la oportunidad de realizar la expedición. La colaboración del Programa Antártico Brasileño que fue de gran ayuda en la estancia realizada en la Antártida.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a la Doctora. Nardy Diez que a lo largo de esto 3 años a su cargo se convirtió en más que una mentora, me ha guiado magníficamente no solo en el proceso académico sino en mi vida en general. Al MSc. Jeffrey Vargas que dedico de su tiempo a enseñarme prácticamente todo lo que se dentro del área de proteómica y laboratorio, que al igual de la Doctora se convirtió en una gran guía en mi vida. A mi familia que a pesar de no entender el mundo maravilloso de la biología al que decidí dedicar el resto de mi vida, me apoyaron inconmensurablemente. A mi hermano Franchesco y mi abuelito Edilberto que de seguro se sienten orgullosos de mí desde el cielo. A mis amigos, Melany, Daniela, Ariana, Christian, Valentina, Sebastián, Sara, Nina, Gualana, Celine, Myriam, Benjamín, Nicolás y muchos más, que sin ellos esta etapa no hubiera tenido el mismo significado que tiene ahora, me llevo un pedacito de cada uno hasta el fin del mundo. Por último, a mi compañero más leal, Maximillion Pegasus; mi perro, que estuvo conmigo desde el día cero y estoy seguro que seguirá fervientemente a mi lado apoyándome y amándome como siempre lo ha hecho y hará.

Declaración Expresa

Yo Jimmy Michael Chóez Dominguez acuerdo y 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, 24 de mayo del 2025.



Jimmy Michel

Chóez Dominguez

1. Evaluadores

Luis Lenin Galarza

Profesor de Materia

Nardy Diez Del Valle

Tutor de proyecto

Resumen

El tratamiento biológico de aguas residuales presenta una baja eficiencia en regiones frías debido a que los microorganismos comúnmente utilizados son mesófilos. Este proyecto evalúa el potencial biotecnológico de microorganismos antárticos psicrotolerantes para optimizar la biorremediación de materia orgánica en estas condiciones. Se recolectaron muestras en la Isla Rey Jorge, Antártida, de las cuales se aislaron 266 cepas bacterianas mediante enriquecimiento en agua residual sintética. La metodología incluyó un cribado cualitativo de actividad enzimática a 15 °C y una cuantificación de la producción de amilasas, proteasas, lipasas y ureasas a 20 °C. Con los aislados de mayor rendimiento, como *Exiguobacterium antarcticum* y *Serratia surfactantfaciens*, se formularon dos consorcios bacterianos. Los resultados demostraron que el consorcio diseñado por especialización funcional (C1) logró una remoción de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) cercana al 50% en 168 horas, duplicando la eficiencia del segundo consorcio. El análisis estadístico indica que el consorcio es robusto y eficiente incluso a bajas concentraciones de inóculo. Se concluye que los ecosistemas antárticos son una fuente valiosa de microorganismos para desarrollar soluciones biotecnológicas eficientes y económicamente viables para el tratamiento de efluentes en climas fríos.

Palabras claves: Psicrotolerantes, tratamiento de aguas residuales, enzimas extracelulares, DQO, extremófilos.

Abstract

Biological wastewater treatment shows low efficiency in cold regions because the microorganisms commonly used are mesophilic. This project evaluates the biotechnological potential of psychrotolerant Antarctic microorganisms to optimize the bioremediation of organic matter under these conditions. Samples were collected on King George Island, Antarctica, from which 266 bacterial strains were isolated through enrichment in synthetic wastewater. The methodology included a qualitative screening of enzymatic activity at 15°C and a quantification of the production of amylases, proteases, lipases, and ureases at 20°C. With the highest-performing isolates, such as *Exiguobacterium antarcticum* and *Serratia surfactantfaciens*, two bacterial consortia were formulated. The results showed that the consortium designed for functional specialization (C1) achieved a Chemical Oxygen Demand (COD) removal of nearly 50% in 168 hours, doubling the efficiency of the second consortium. Statistical analysis indicates that the consortium is robust and efficient even at low inoculum concentrations. It is concluded that Antarctic ecosystems are a valuable source of microorganisms for developing efficient and economically viable biotechnological solutions for effluent treatment in cold climates.

Indice general

Tabla de contenido

1.1	Introducción	13
1.2	Descripción del problema	14
1.3	Justificación del problema	15
1.4	Objetivos	15
1.4.1	Objetivo general:	16
1.4.2	Objetivos específicos:	16
1.5	Marco teórico	16
1.5.1	Contaminación por Materia Orgánica y Tratamiento de Aguas Residuales	16
1.5.2	Biorremediación de Efluentes y la Limitación Crítica de la Temperatura	18
1.5.3	Microbiología antártica y su potencial Biotecnológico	20
1.5.4	Desarrollo de Consorcios Microbianos para la Optimización del Tratamiento de Aguas Residuales.....	21
2	Metodología	25
2.1	Muestreo	25
2.2	Aislamiento de microorganismos antárticos	26
2.3	Bioprospección enzimática	27
2.4	Producción enzimática	28
2.5	Ensayo enzimático	30
2.6	Conformación de Consorcio.....	31
2.7	Medición de DQO y DBO	31
3	Resultados.....	32
3.1	Aislamiento y caracterización	32
3.2	Cuantificación de actividad enzimática	33
3.3	Ensayo de degradación de aguas residuales	37
4	Conclusiones	41
5	Referencias Bibliográficas	42

Abreviaturas

ROS Residuos Orgánicos Sólidos

PTAR Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

DQO Demanda Química de Oxígeno

DBO Demanda Bioquímica de Oxígeno

CO₂ Dióxido de Carbono

NBA Nutrient Broth Agar

ARS Agua Residual Sintética

Simbología

g Gramo

Índice de figuras

Ilustración 1 <i>Mapa de zona de muestreo en la Isla Rey Jorge.</i>	25
Ilustración 2 <i>Resultados de la prueba cuantitativa para la enzima amilasa</i>	34
Ilustración 3 <i>Resultados de la prueba cuantitativa para la enzima proteasa</i>	34
Ilustración 4 <i>Resultados de la prueba cuantitativa para la enzima ureasa</i>	35
Ilustración 5 <i>Resultados de la prueba cuantitativa para la enzima lipasa</i>	36
Ilustración 6 <i>Resultados del primer ensayo de reducción de DQO con los consorcios conformados</i>	38
Ilustración 7 <i>Resultados de reducción de DQO con diferentes concentraciones de consorcio</i>	39

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Coordenadas geográficas de la zona de muestreo en la isla Rey Jorge</i>	26
Tabla 2 <i>Resultados de la prueba de halo de degradación de sustrato orgánico.</i>	33
Tabla 3 <i>Tabla general de resultados cualitativos y cuantitativos de los mejores aislados.</i>	36
Tabla 4 <i>Resultados de la identificación molecular mediante secuenciación de los mejores aislados</i>	37
Tabla 5 <i>Parámetros para el análisis estadístico</i>	39
Tabla 6 <i>Resultados del análisis estadístico de sus variables y sus combinaciones.</i>	40
Tabla 7 <i>Resultados del análisis estadístico de la comparación de tiempos.</i>	40

Capítulo 1

1.1 Introducción

El crecimiento exponencial de la población mundial de las últimas décadas incrementa la generación de residuos. Tanto residuos inorgánicos como orgánicos presentan un problema para la salud humana. Según el Banco Mundial, actualmente se producen más de 2.01 billones de toneladas de desechos por año en el mundo, dentro del 32% al 50% de los residuos son orgánicos (Kaza et al., 2018). Este porcentaje alcanza su ápice en países no desarrollados o en vías de desarrollo. En dichos países se estima que más del 90% de los residuos no cuentan con un manejo adecuado terminando en vertederos abiertos o incinerados. Un porcentaje significativo de esta materia orgánica es también operada a través de sistemas de alcantarillado o se filtran a través de lixiviados, esto contribuye directamente a la alta carga contaminante de las aguas residuales domésticas e industriales, una situación igual de crítica.

Actualmente las estrategias de manejo de residuos orgánicos usados son vertederos, incineración, reciclaje, compostaje, reducción de la fuente y digestión anaeróbica (Younis Ahmad et al., 2023). Los métodos de compostaje y digestión anaeróbica son los más comunes para la implementación de microorganismos como agentes biológicos reductores. Los microorganismos usados actualmente para estas estrategias tales como *B. subtilis*, *pseudomonas*, *endophytes*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, entre otros son mesófilos (Saeed et al., 2022). Teniendo un rango de temperatura óptimo que va desde los 27 °C hasta los 55 °C, dependiendo de la especie (Leow et al., 2018). Pero entonces, ¿qué pasa con los países que presentan bajas temperaturas? Donde el ciclo metabólico de estos microorganismos se ve afectado. Países como Argentina, Chile o regiones montañosas como Los Andes donde presentan amplias fluctuaciones térmicas necesitan un enfoque especializado adaptado a sus limitantes.

Los microorganismos psicrófilos o psicrotolerantes son organismos que están adaptados a las bajas temperaturas y donde su ciclo metabólico no se ve afectado por dichas temperaturas permitiendo que puedan degradar residuos orgánicos de forma eficiente en comparación con organismos mesófilos (Rodríguez-Gonzales et al., 2022). El uso de estos microorganismos dentro de las actuales estrategias de manejo de residuos orgánicos resulta una opción interesante al no impactar en el ecosistema como otras

estrategias y actuar sobre los actuales métodos sin generar gastos adicionales que pueden afectar a países poco desarrollados.

1.2 Descripción del problema

Existe una limitación crítica en el tratamiento biológico de aguas residuales en países en vías de desarrollo enfrenta una limitación crítica: la baja eficiencia en la remoción de materia orgánica en regiones frías donde en el peor de los casos la disposición final inadecuada de la fracción orgánica constituye hasta un 50% del total. Esta situación genera focos de contaminación y la emisión descontrolada de gases de efecto invernadero. Las tecnologías de valorización biológica, como el compostaje y la digestión anaeróbica, son soluciones sostenibles, pero su eficiencia depende directamente de la actividad de los consorcios microbianos empleados.

El problema técnico central radica en que los microorganismos comerciales y nativos comúnmente utilizados (*Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aspergillus sp.*) son mesófilos, con un rendimiento óptimo en rangos de temperatura de 25 °C a 45 °C. A temperaturas inferiores a 15 °C, su tasa metabólica se reduce drásticamente. Esta variable, la baja temperatura, se convierte en un factor limitante en países con estaciones frías o en regiones de gran altitud, como la sierra andina de Ecuador. Como consecuencia, los procesos de tratamiento biológico en estas zonas se vuelven ineficientes, resultando en:

- Tiempos de degradación excesivamente largos.
- Descomposición incompleta de la materia orgánica.
- Baja eficiencia en la reducción de las variables de control ambiental como la

Demanda Química de Oxígeno (DQO) y la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO).

El ámbito de acción de este proyecto se limita a abordar esta brecha tecnológica, enfocándose en la bioprospección y aplicación de microorganismos psicrotolerantes capaces de degradar eficientemente la materia orgánica a bajas y moderadas temperaturas, para optimizar los sistemas de tratamiento biológico existentes sin incurrir en costos energéticos adicionales.

1.3 Justificación del problema

La necesidad de abordar la problemática descrita se justifica desde tres perspectivas complementarias: ambiental, económica y científica.

Ambientalmente, tratamiento deficiente de aguas residuales en climas fríos perpetúa la contaminación de suelos y acuíferos por lixiviados y la emisión de metano desde vertederos, un gas con un potencial de calentamiento global significativamente mayor que el CO₂. Desarrollar un método de tratamiento biológico que sea eficiente durante todo el año en estas regiones es, por tanto, un imperativo para la mitigación del cambio climático y la protección de los ecosistemas locales.

Económicamente, las soluciones actuales son insostenibles. Obligar a los municipios o industrias de países en desarrollo a calentar sus sistemas de compostaje o biorreactores es una barrera insuperable que fomenta la falta de toma de decisiones. Este proyecto busca desarrollar una solución biotecnológica de bajo costo, que se integre a la infraestructura existente y que sea funcional en las condiciones ambientales locales, promoviendo una economía circular que es a la vez viable y efectiva.

Científicamente, existe una brecha de conocimiento aplicada. Si bien se conoce el potencial de los extremófilos, la bioprospección de microorganismos en ecosistemas únicos como la Antártida para la formulación de consorcios microbianos sinérgicos y especializados en la degradación de materia orgánica en efluentes a bajas temperaturas es un campo con un vasto potencial por explorar. Este proyecto es relevante porque no solo busca aislar cepas individuales, sino evaluar su rendimiento y compatibilidad como un consorcio, lo cual aumenta la robustez y eficiencia del tratamiento.

Por lo tanto, este trabajo se justifica en su propósito de generar una solución innovadora y pertinente a un problema real, mediante la exploración de la biodiversidad antártica para desarrollar una herramienta biotecnológica que mejore la sostenibilidad ambiental y la viabilidad económica de la gestión de residuos orgánicos en regiones frías.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general:

Evaluar el potencial biotecnológico de microorganismos antárticos psicrotolerantes, individualmente y en consorcios, para la degradación eficiente de materia orgánica, con enfoque a su aplicación en procesos de biorremediación de aguas residuales.

1.4.2 Objetivos específicos:

- Aislar, caracterizar y seleccionar microorganismos antárticos con base en su capacidad para degradar diversos sustratos orgánicos a bajas temperaturas.
- Cuantificar la eficiencia de degradación de materia orgánica de las cepas seleccionadas y desarrollar consorcios microbianos compatibles y funcionales entre aislados.
- Evaluar la capacidad de los consorcios microbianos formulados para reducir la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) en muestras representativas de efluentes orgánicos.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Contaminación por Materia Orgánica y Tratamiento de Aguas Residuales

1.5.1.1 La Problemática Global de la Contaminación Orgánica

Los residuos sólidos urbanos son todos los materiales que son producidos a partir de las actividades diarias y que son desechadas por su inutilidad. Su principal causa la forma de organización de las personas ((Marchan-Solier et al., 2021). Uno de los métodos para la clasificación de los Residuos Sólidos Urbanos es por composición química, dividiéndose en 2 grupos: los orgánicos como papel, restos de comida, cartón y los inorgánicos como metales, plásticos, vidrios (Esparza, 2021). Los residuos sólidos orgánicos son un eje a nivel mundial para la reducción de riesgo para la salud de los habitantes, en los últimos 15 años varias propuestas se han llevado a cabo para reducir los residuos sólidos orgánicos. Su reducción implica varios beneficios ambientales como reducción de gases de efecto invernadero, menos

uso de suelo para la deposición de residuos, menos generación de lixiviados contaminantes (Jantz & Ruggerio, 2021).

En Ecuador se generan alrededor de 375 000 toneladas de residuos sólidos urbanos por año, del cual el 57% son orgánicos y el 43% son inorgánicos (Rodríguez Guerra & Baca Cajas, 2022). Esto quiere decir que anualmente se producen cerca de 213 750 toneladas de residuos orgánicos sólidos y de esta cantidad solo el 4% es tratado por centros de acopio.

1.5.1.2 Aguas Residuales Urbanas como Foco de Contaminación Orgánica

El agua residual se puede definir como cualquier líquido o agua que presente impurezas o contaminantes sólidos, líquidos, gases o la combinación de ellos en concentraciones que sean perjudiciales si se vertieran al medio ambiente (De KARIA et al., 2023). Los sólidos dentro de las aguas residuales son las que otorgan impurezas en ellas y estos pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica. Además, pueden presentarse en forma de suspensión, coloidal, disuelto o sus combinaciones. El fin de toda agua residual es ser vertida en masas de agua o en la tierra, mientras que, el límite de impurezas lo determinan las autoridades locales, por lo que, dar un panorama a nivel global es complejo.

Se puede clasificar según su fuente de generación en 2 tipos: aguas residuales domésticas, agua que ha sido usada y descargada de zonas comerciales, residenciales e institucionales de una ciudad, pueblo o comunidad y se recolecta a través de un sistema de alcantarillado; aguas residuales industriales, son las aguas residuales producidas por medianas y grandes empresas o industrias, estas aguas son las más variables, ya que, cambian de industria a industria e incluso de proceso a proceso dentro de la misma industria. Toda esta materia orgánica afecta negativamente al paradero final de las aguas residuales, puesto que estas contienen demasiada carga orgánica que arruina el equilibrio ecosistémico, así como los servicios que brindan los efluentes y ecosistemas inmediatos ((Camarena et al., 2024).

Para la determinación de impurezas en las aguas residuales se usan mayormente 2 parámetros, la demanda química de oxígeno (DQO) y demanda bioquímica de oxígeno (DBO). La DQO es la

equivalencia de oxígeno para los materiales orgánicos en la muestra que pueden ser oxidados de forma química ((Morales-Mejía et al., 2021). Mientras que, DBO es la cantidad de oxígeno que necesitan los microorganismos para la estabilización de materia orgánica en un tiempo y temperatura específicos, que influyen de forma directa en la magnitud de oxígeno disuelto presente en el agua (Oblitas Abanto, 2022).

1.5.1.3 *Tecnologías Actuales para el Tratamiento de Aguas Residuales*

Para darle un correcto tratamiento a las aguas residuales se necesita saber cuáles son los límites de vertido para el cuerpo de agua receptor. Según estos parámetros se pueden dividir en 3 tipos de tratamientos: los primarios, donde se busca una eliminación d los sólidos suspendidos y materiales flotantes mediante métodos físicos como la sedimentación; los secundarios engloban tratamientos biológicos convencionales donde se incluyen estrategias como lodos activos, filtros biológicos, tratamientos anaeróbicos, etcétera; los terciarios buscan eliminar de forma química los elementos que no son tratables con métodos secundarios (Ramalho, 2021).

Los tratamientos secundarios, al usar componentes biológicos dependen mucho de la actividad microbiana. Los lodos activos son proceso biológico aerobio donde se busca recuperar aguas contaminadas o cargadas a su estado original mediante una depuración entre un grupo de microorganismos formados en un tanque de aeración y las aguas residuales (Ramírez Jiménez, 2021). En los tratamientos aeróbicos se usa un conjunto de organismos aerobios o facultativos que consumen oxígeno en procesos de oxidación biológica dando como resultado CO₂, energía y más microorganismos (Mendoza et al., 2021).

1.5.2 *Biorremediación de Efluentes y la Limitación Crítica de la Temperatura*

1.5.2.1 *Biorremediación Aplicada al Tratamiento de Aguas Residuales*

Dependiendo del origen de las aguas residuales podemos encontrar diferentes componentes como compuestos nitrogenados, carbono y fósforo en altas concentraciones que pueden deteriorar el medio ambiente al interrumpir el equilibrio ecosistémico (Fernández et al., 2023). La biorremediación permite

devolver el recurso hídrico en condiciones iguales o mejores a las iniciales, lo cual es vital cuando buscamos una conservación de este recurso, una óptima rentabilidad y sostenibilidad en términos de producción.

La biorremediación implica muchos componentes, uno de los más vitales son los microorganismos, ya que, pueden transformar elementos tóxicos en CO₂, agua u otros compuestos menos tóxicos y estos a su vez pueden ser degradados por otros microorganismos. Para realizar procesos de biorremediación podemos usar bacterias, hongos, algas, entre otros. Los más comunes son bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Aspergillus*, *Pseudomonas* por su amplia gama de sustratos que usan como fuente de carbono y la capacidad de proliferar en entornos extremos, por lo que, escoger el organismo específico para el trabajo específico es importante(Ayilara & Babalola, 2023).

1.5.2.2 La Temperatura como Factor Limitante en el Tratamiento Biológico

Los tratamientos biológicos actuales usan organismos mesófilos, que trabajan en óptimas condiciones a temperatura ambiente, entre 25 a 45 °C. Cuando un organismo no está dentro de sus temperaturas óptimas presenta una menor tasa de crecimiento, reducción de su metabolismo o incluso la muerte. Los organismos mesófilos a bajas temperaturas presentan un choque térmico que afecta su cinética enzimática involucrada en procesos biológicos de absorción de nutrientes, también, en mecanismos de síntesis de proteínas, crecimiento celular, expresión de genes implicadas en vías de metabolismo específicas, entre otros(Rapuano & Graziano, 2022).

1.5.2.3 Microorganismos Psicrotolerantes y Psicrófilos: La Solución al Frio

Los microorganismos psicrófilos son aquellos que prosperan en el frío y crecen a bajas temperaturas, en un rango de entre 0 a 20 °C, teniendo una temperatura óptima alrededor de los 15 °C. Los psicrotolerantes son aquellos que pueden crecer a bajas temperaturas y también a temperaturas un poco más elevadas similares a mesófilos. Siendo su principal diferencia el rango de temperatura de crecimiento(Kanekar & Kanekar, 2022). Entre sus adaptaciones fisiológicas presenta mecanismos de

composición de proteínas, inactivación de enzimas y modificación de estructuras celulares produciendo proteínas de choque térmico, anticongelantes, crioprotectores y activas en frío. Los organismos psicrofílos están presentes en ambientes fríos como glaciares, desiertos fríos, superficies polares, entre otros (Kim et al., 2021).

1.5.3 Microbiología antártica y su potencial Biotecnológico

1.5.3.1 *El Ecosistema Antártico como Laboratorio Natural de Extremófilos*

Las investigaciones antárticas en su mayoría se desarrollan en la Isla Rey Jorge, debido a su fácil acceso. IRJ cuenta con 13 estaciones de investigación en varios puntos de la costa en la isla, ya que, el 90% de la isla está cubierta de glaciares (Dziembowski & Bialik, 2022). El clima en dicha isla está ligado por el clima subpolar y el marino teniendo una temperatura promedio de -1.7°C (min. $=-5.7^{\circ}\text{C}$ en julio, máx. $=1.9^{\circ}\text{C}$ en enero). Si bien, su clima es extremadamente frío la región antártica presenta una impresionante vida microbiana. Las comunidades microbianas bacterianas, eucariotas, arqueas e incluso los virus, constituyen parte fundamental para el ecosistema antártico (Abirami et al., 2021). Alrededor del 78% de las unidades taxonómicas operacionales bacterianas de las aguas oceánicas superficiales antárticas son exclusivas de este polo, su diversidad microbiana está influenciada por luz, viento, nutrientes, salinidad, temperatura del sitio del muestreo.

1.5.3.2 *Adaptaciones Moleculares de los Microorganismos al Frío*

Los microorganismos presentan una gran variedad de mecanismos de supervivencia frente al frío, estas adaptaciones pueden ser únicas dependiendo de la especie (Shen et al., 2021), entre las más comunes tenemos:

Regulación de la fluidez de la membrana celular. - Este se da a través de varios mecanismos relacionados a los lípidos y las proteínas presentes en la membrana. El estado de la bicapa varía de fluido de desordenado y delgado a ordenado y grueso con cadenas de ácidos grasos a la temperatura del organismo a una organización de fluido aniónico (Cecconet et al., 2022). Otro componente clave es la

regulación de la desaturación de ácidos grasos que puede degradar ácidos grasos ramificados y polinsaturados, los cuales son importantes en el mantenimiento de la fluidez de la membrana celular.

Proteínas adaptadas al frío. - Este mecanismo hace referencia a las proteínas que se sobreexpresan en condiciones de frío y son usadas para mantener las actividades fisiológicas regulares de los organismos. Las dos más importantes son las proteínas de choque térmico y las proteínas que se adhieren al hielo. Las primeras actúan como un abrigo de ARN que ajusta de forma dinámica la estructura secundaria del ARNm para la regulación global de niveles de expresión de proteínas (Shen et al., 2021). Las segundas funciones como las proteínas anticoagulantes que reducen la temperatura de congelación e inhiben el crecimiento de los cristales de hielo.

1.5.3.3 *Potencial de los microorganismos antárticos en la biodegradación de efluentes*

El rendimiento en tecnologías de tratamiento de aguas residuales depende es notoriamente mejor en climas cálidos, y en condiciones psicrófilas puede generar el uso de calentamiento adicional para calentar los reactores dando balances energéticos negativos. Los microorganismos psicrotolerantes al contar con adaptaciones para estas condiciones climáticas presentan una ventaja significativa, ya que, pueden ser usados tanto en condiciones frías como en condiciones mesófilas. En un estudio a escala piloto de campo para el TAR municipales se concluyó que la temperatura es muy importante para el correcto desarrollo del proceso y que con una combinación de estrategias donde implicaban la fomentación de digestores anaeróbicos de lodos con organismos psicrófilos mejoró el rendimiento del tratamiento en términos de reducción de materia orgánica y producción de metano a bajas temperaturas.

1.5.4 Desarrollo de Consorcios Microbianos para la Optimización del Tratamiento de Aguas Residuales

1.5.4.1 *Fundamentos de los Consorcios Microbianos*

Los consorcios microbianos son grupos indefinidos o definidos de bacterias, hongos, levaduras, etc., que pueden trabajar juntos con un propósito específico como la degradación de un compuesto. En

biorremediación surgieron como respuesta a las limitantes de usar un solo organismo frente a contaminantes complejos como condiciones de estrés y obstáculo de metabolismo (Mittermeier et al., 2023). Los consorcios microbianos suelen mostrar multifuncionalidad y resistencia acorde a las diversas especies que trabajan juntas para el aprovechamiento de todas las formas de sustratos. Cuando se distribuye el trabajo entre las diferentes cepas del sistema se pueden evitar las limitantes consecuentes de la carga metabólica de la sobreexpresión génica, inhibidores, acumulación de subproductos, entre otros. El equilibrio dinámico que se produce entre las cepas de un consorcio les da una fuerte resiliencia frente a entornos complejos con fluctuaciones ambientales (Li et al., 2021).

1.5.4.2 Estrategias de Aislamiento y Selección para la Formulación de Consorcios

Para el correcto aislamiento de los microorganismos se utilizan presiones selectivas como el enriquecimiento inducido que consiste en promover el crecimiento de una comunidad microbiana adaptada a un tipo específico de sustrato o contaminante en el caso de la biorremediación (Li et al., 2021). Esto permite obtener microorganismos con la capacidad metabólica de interés y descartar a los que no permitiendo su posterior cultivo axénico.

Los cultivos axénicos son cepas monoespecíficas que crecen en condiciones específicas, es decir, los aislados sin ningún tipo de contaminación. En muchas ocasiones las condiciones para el desarrollo de un microorganismo son recalcitrantes, lo que impide su uso en programas de consorcios microbianos donde la sinergia microbiana cambie las condiciones biológicas del entorno (Cao et al., 2022). Escoger el método de axenicidad es esencial para poder obtener aislados específicos y estables.

Por último, la coexistencia de los microorganismos es fundamental, en un entorno natural los microorganismos rara vez se encuentran aislados, mayormente coexisten como microcolonias o biopelículas. Siempre existe una posible interacción entre microorganismos y esta puede ser buena o mala (Dextro et al., 2024). Cuando las interacciones son positivas, la relación se llama sinergismo y se define como la interacción entre microbios donde todas las partes se benefician, mientras que una

interacción negativa se denomina antagonismo (Salinas et al., 2023). En la formulación de un consorcio microbiano se busca que todas las cepas sean sinergistas para que promuevan su crecimiento y proliferación (Sarsan et al., 2021).

1.5.4.3 Evaluación de la Eficiencia del Consorcio Mediante DQO y DBO

Poder determinar el nivel de riesgo de un agua residual de forma cuantitativa es esencial. El inadecuado manejo de estas aguas en el siglo XXI ha producido el 4% de muertes a nivel mundial y el 5.7% de la carga de enfermedades en el mundo. El DQO y DBO se utilizan para cuantificar aguas residuales debido a que en conjunto permiten evaluar su grado de contaminación y su biodegradabilidad (Tauzene Afonso Matangue et al., 2018).

El DQO se utiliza para medir la fuerza de los contaminantes en las aguas residuales, pero presenta una desventaja principal, mide los contaminantes biodegradables y los no biodegradables, por lo que, no permite medir por si sola la capacidad biodegradable del agua residual. Mientras que, el DBO se limita solo a dar la fracción biodegradable. Al relacionar ambos parámetros obtenemos DBO_5 / DQO , dicha relación nos permite medir la biodegradabilidad de la materia orgánica presente en el agua residual. Se consideran los valores mayores a 0.5 altamente biodegradables y los inferiores a 0.5 como poco degradables (Tran et al., 2015).

Capítulo 2

2 Metodología

2.1 Muestreo

La recolección de muestras se realizó durante la Expedición Antártica Chilena No. 58/ Expedición Ecuatoriana No. 26 en el primer mes de 2023 dentro del verano antártico. Se recolectaron veinticuatro muestras de varios sitios costeros y en alrededores de las bases dentro de la Isla Rey Jorge. Los datos de coordenadas geográficas de las 43 muestras recogidas fueron obtenidos mediante el Sistema de Información Geográfica (Quantum GIS 3.16.0) y están detallados en la Tabla X y Fig. X. Las zonas específicas que se tomaron en cuenta para la selección de muestras fueron 24 incluyendo zona costera, líquenes y musgos, anidamientos de aves, áreas de fusión y áreas con abundante materia orgánica. Se recolectaron alrededor de 50 gramos de suelo por muestra utilizando una pala metálica y fueron depositados en tubos falcon de 50 ml o bolsas ziploc, ambos estériles. Las muestras se guardaron a -20 °C hasta su transporte y procesamiento.

Ilustración 1

Mapa de zona de muestreo en la Isla Rey Jorge.

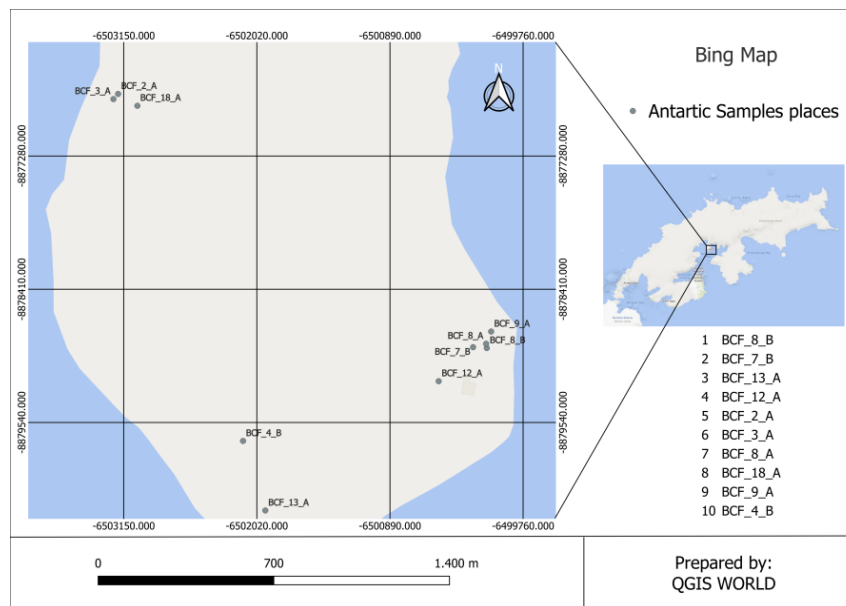


Tabla 1*Coordenadas geográficas de la zona de muestreo en la isla Rey Jorge*

Geographical coordinates		
Sample	Latitude (S)	Longitude(W)
BCF_11_B	62° 5' 4.649	58° 23' 37.250
BCF_12_A	62° 5' 3.950	58° 23' 41.179
BCF_13_A	62° 5' 20.549	58° 24' 28.779
BCF_18_A	62° 5' 9.339	58° 25' 5.609
BCF_2_A	62° 4' 27.049	58° 25' 9.190
BCF_3_A	62° 4' 27.709	58° 24' 59.859
BCF_4_B	62° 5' 11.619	58° 24' 34.890
BCF_6_A	62° 4' 28.690	58° 25' 1.390
BCF_7_B	62° 4' 59.579	58° 23' 31.739
BCF_8_A	62° 4' 59.140	58° 23' 28.160
BCF_8_B	62° 4' 59.690	58° 23' 27.970
BCF_9_A	62° 4' 57.570	58° 23' 26.769
BECU_1_A	62° 7' 16.999	58° 23' 37.359

2.2 Aislamiento de microorganismos antárticos

Para este estudio, se seleccionaron 24 muestras que fueron procesadas de dos maneras. Creando dos grupos que fueron denominados arbitrariamente “A” para el primero y “B” para el segundo. En ambos casos se siguió el protocolo de aislamiento propuesto por (Pulschen et al., 2017) modificado. Donde se reemplazó la solución salina por agua residual sintética doméstica planteado por (Guerrero et al., 2009) compuesta de 200 mg/L almidón, 21 mg/L ovoalbumina, 0.03 ml/L aceite de oliva, 13 mg/L urea, 5.26 mg/L KH_2PO_4 , 22.05 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.43 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 21.3 mg/L KCL, 8.76 NaHCO_3 , 100 mg/L extracto de levadura, 1 ml/L solución de micronutrientes usada para la actividad de ureasa, la solución de micronutrientes fue reemplazada por una solución de traza dada por (Liu et al., 2013). Cada muestra fue plaqueada en una difusión serial con proporción de 1:10 de Nutrient Broth Agar (NBA) compuesto de 0.8 g/L BD DIFCO™ Nutrient Broth, 10 g/L BD BACTO™ Agar. Luego, se incubaron las placas a 15 °C por 15 días en condiciones oscuras, según (Danilovich et al., 2018). Después de la incubación, se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) para cada dilución y replicado.

Por último, se transfirieron a placas con NBA fresco las colonias con morfotipos distintivos usando palillos de dientes estériles e incubándolas en las condiciones antes mencionadas. Para la selección inicial de aislados se utilizó su textura, forma, color, sustrato como características de crecimiento macroscópico. Tanto los colores de los aislados como su producción de pigmento fueron medidos con su código HEX mediante la aplicación móvil Color Grab V3. 9. 2 LOOMATIX (www.loomatix.com). Además, se realizó la técnica de tinción de Gram para la caracterización microscópica propuesta por (Tripathi & Sapra, 2020). Los aislados seleccionados fueron puestos en placas Petri con BD DIFCO™ Nutriente Agar siguiendo la concentración propuesta por el fabricante e incubándolas a las mismas condiciones anteriores.

2.3 Bioprospección enzimática

Para determinar las actividades enzimáticas de cada aislado se tomaron en cuenta cinco diferentes sustratos, almidón, aceite de girasol, gelatina, leche descremada y urea para la actividad enzimática de amilasa, lipasa, gelatinasa, proteasa y ureasa respectivamente. El protocolo seguido para los tres primeros sustratos fue el propuesto por (Danilovich et al., 2018) modificado ligeramente en cuanto a la inoculación de las placas donde pasó de ser 10 µl de medio de crecimiento activo a inoculación por picadura de los aislados crecidos en BD DIFCO™ Nutrient Agar. Para la degradación de leche se usó el protocolo planteado por (Salwan et al., 2020) y para la actividad hidrolítica de urea se usó el protocolo propuesto por (Hirani et al., 2022) Modificado donde se reemplazó el fosfato de potasio monobásico por peptona. Todos los ensayos se incubaron por 7 días a 15 °C luego de eso se realizó la verificación de los resultados mediante la observación de un halo de degradación al alrededor de la colonia u otros métodos explicados a continuación. Y se utilizó la herramienta Imagen J para la determinación del halo y el crecimiento de la colonia usando la siguiente fórmula para determinar a los mejores.

$$\text{Degradación del sustrato} = \phi \text{ halo} - \phi \text{ colonia}$$

Degradación de almidón – Para esta degradación se usó agar nutritivo compuesto de 5g/L peptona, 5g/L extracto de levadura, 5g/L NaCl, 15 g/L agar, adicionando 10g/L de almidón soluble para esta prueba en particular. La hidrólisis del almidón se observó mediante la presencia halos claros alrededor de cada colonia una vez teñida con solución de yodo Lugol.

Degradación de aceite – Para esta prueba se usó el agar nutritivo descrito anteriormente, omitiendo los 5 g/L agar, se añadió 20 g/L goma arábiga, 1 g/L rodamina B y 3% (v/v) aceite de oliva. Su actividad enzimática se observó exponiendo las placas a luz UV, donde se marcaron positivo a las colonias con una zona naranja-rosa fluorescente alrededor de las colonias.

Degradación de gelatina – Se le agregó al medio de agar nutritivo 12%(w/v) de gelatina pura. Su actividad hidrolítica se observó mediante un halo traslucido alrededor de las colonias y la generación de licuefacción como marcadores positivos.

Degradación de leche – Se utilizó el medio TM MEDIA® Skim Milk Agar el cual es un medio que contiene cantidad de leche descremada suficiente para la prueba. El resultado positivo se notó por un halo claro alrededor de cada colonia.

Degradación de urea – El medio consistió en 1 g/L peptona, 1 g/L dextrosa, 5 g/L NaCl, 15g/L agar, 15 g/L urea y 0.012 g/L rojo fenol. El resultado de esta prueba se evidenció con el cambio de coloración alrededor de las colonias, tornándose de amarillo a rosa.

2.4 Producción enzimática

Se usó un medio específico para cada tipo de sustrato, que permitió el crecimiento óptimo del microorganismo y una buena producción enzimática. El protocolo seguido para la producción enzimática amilasa fue el propuesto por (Mishra et al., 2014), el método usado para la producción de proteasas (se utilizó para los sustratos de gelatina y leche descremada) fue el expuesto por (Lakshmi et al., 2014) el protocolo para la producción de lipasa usado fue dado por (Al Mohaini et al., 2022), finalmente para la producción de ureasa se manejó el protocolo de (Lapierre et al., 2022) descritos a continuación.

Producción de amilasa – Se preparó un medio compuesto de 1 g/L KH_2PO_4 , 2.5 g/L NaH_2PO_4 , 1 g/L NaCl, 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/L CaCl_2 , 2 g/L triptona, 10 g/L almidón soluble y pH 7.0. Cada aislado con una bioprospección positiva fue inoculado por picadura en 200 ml de este medio a 20 °C con una revolución de 120 rpm por 8 días. Luego de esto se extrajo una muestra de 15 ml la cual se centrifugó a 5000 rpm a 4 °C por 15 minutos, conservando el sobrenadante y descartando el pellet.

Producción de lipasa – Para este ensayo se usó un medio de crecimiento enzimático LIFE INVITROGEN™ Luria Bertani Broth Base (Lennox Broth Base) con aceite de oliva en cantidades de 250 ml y 10 ml respectivamente con pH ajustado a 7.2. Las condiciones de incubación fueron 20 °C, con agitación a 150 rpm por 8 días.

Producción de ureasa – para el cultivo de los microorganismos con bioprospección positiva se usó un medio de CaSO_4 con pH ajustado a 7.5 compuesto de 10 g/L glucosa, 20 g/L urea, 20 g/L peptona, 1.7 g/L K_2HPO_4 , 5 g/L NaCl, 50 ml/L de solución de caldo de micronutrientes y 5 ml/L de solución de caldo de hierro. La solución de caldo de micronutrientes contiene 8.54 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.18 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.56 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.085 g/L $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.2 g/L EDTA. La solución de caldo de hierro consiste en 1 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 1g/L FeCl_2 . Se incubó por 8 días a 20 °C con 50 ml del medio en matraces Erlenmeyer de 250 ml usando agitación constante de 300 rpm.

Producción de proteasa – Se utilizó un medio de producción enzimática estándar con 5 g/L glucosa, 7,5 g/L peptona, 1g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 50 ml/L de solución salina compuesta de 5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 5 g/L KH_2PO_4 . Las condiciones de incubación fueron a 20 °C con agitación a 160 rpm por 8 días.

2.5 Ensayo enzimático

Luego del periodo de incubación, se centrifugaron todas las muestras a 4 °C, 12000 rpm por 10 minutos y se prepararon los sobrenadantes para los ensayos, donde, se utilizaron los métodos propuestos en los artículos usados para su producción enzimática, mencionados anteriormente. Las excepciones fueron el ensayo de amilasa donde se usó el método propuesto por (Bernfeld, 1955) y el ensayo enzimático de ureasa (Mekonnen et al., 2021)

Ensayo de amilasa – se colocó 1 ml del sobrenadante en 1 ml de solución de sustrato de almidón e incubó a 20 °C por 3 minutos, luego, se adicionó 1 ml de DNS e hirvió durante 15 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente y se agregó 9 ml de agua desionizada y leyó a 540 nm.

Ensayo de lipasa – se utilizó el método titrimétrico, utilizando una mezcla de reacción con aceite de oliva como sustrato a 7.0 pH, 10% de aceite de oliva emulsionado en 10% de goma arábiga (p/v), 2 ml de solución de cloruro de calcio al 0.6% y 5 ml de tampón fosfato de sodio 0.2 mol/L. Después, se agregó 1 mL de cada solución de enzima lipasa cruda a las mezclas de reacción individualmente. Además, se incubaron una hora a 20 °C a 150 rpm. Luego de la incubación se agregó 20 ml de solución de acetona: etanol (1:1) para la interrupción de la reacción. También, se agregaron 2-3 gotas de indicador de fenolftaleína a cada coctel de reacción. Finalmente, las mezclas de reacción se titularon con una solución de NaOH 0.05 M hasta obtener un punto final de color rosa a 10.0 pH. Para los controles se hizo el mismo procedimiento, pero se cambió el orden de los reactivos añadiendo las enzimas crudas luego del interruptor de reacción.

Ensayo de ureasa – se mezcló 1 ml de medio de producción enzimática inoculado por 24 horas en 9 ml de solución de urea a 1.11 M, se dejó incubar por 5 minutos a 20 °C a 150 rpm. Se midió la conductividad de la mezcla bacteria-urea mediante un conductímetro continuamente durante 5 minutos. Se creó un gráfico de Conductividad vs. Tiempo para cada aislado y se tomó la pendiente del grafico como tasa de cambio de la conductividad. Se multiplicó la tasa por el factor de dilución inicial (10).

Luego, se multiplicó por el factor de conversión (1/pendiente de la curva de calibración) para obtener el resultado en unidades químicas. Finalmente se divide el resultado anterior sobre la densidad óptica del medio a 600 nm, dando como resultado la actividad ureasa específica.

Ensayo de proteasa – 1 ml de la enzima fue añadido en 2 ml de caseína compuesta de 1% p/v en 0.1N glicina – buffer de NaOH con 10 pH, la mezcla fue incubada a 20 °C por 15 minutos. Luego, se añadió 3 ml de ácido tricloroacético al 10 % y centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se tomó 1 ml del sobrenadante fue mezclado con 5 ml de reactivo alcalino de cobre para incubarlo durante 15 minutos. Se agregó 0.5 ml de reactivo folin-ciocalteau y se dejó reposar por 30 minutos, finalmente se midió la absorbancia a 700 nm. El blanco se realizó de igual forma, pero utilizando agua en lugar de enzima.

2.6 Conformación de Consorcio

Luego del ensayo cuantitativo de cada aislado se utilizaron 2 caracteres para la creación de una lista con candidatos a consorcios microbianos. Del universo de aislados con actividad positiva se escogió a los que obtuvieron una mayor degradación de un sustrato específico y mayor cantidad de sustratos degradados, con resultados significativos. Se seleccionaron a los 4 mejores de ambos caracteres mencionados para la integración de cada consorcio, se incubó cada aislado seleccionado en medio Luria-Bertani Broth a 12 °C, 170 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica óptima $ODS_{600} = 1$, una vez alcanzada la densidad deseada se realizó una solución con los aislados para cada consorcio en proporciones 1:1 y se conservó a 4 °C hasta la siguiente Fase. Adicionalmente, se extrajo la biomasa de cada aislado incubado mediante centrifugación a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C y se conservó a la temperatura anterior para la segunda fase de la medición de DQO y DBO.

2.7 Medición de DQO y DBO

Se realizó un ensayo de degradación de materia orgánica en medio de agua residual sintética explicado anteriormente, para la realización de este ensayo se trabajó con el laboratorio de aguas de la

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de ESPOL. Se estableció un diseño experimental compuesto de 2 factores. El primer factor compuesto de 2 niveles, el primer nivel fue el consorcio microbiano 1 (C1) el cual tiene a los aislados con una mayor actividad enzimática de sustrato específico y el segundo nivel con el consorcio microbiano 2 (C2) el cual tiene a los aislados con mayor cantidad de sustratos degradados, el segundo factor contó con un solo nivel, la temperatura (T1), la cual estuvo a 20 °C. Para el primer ensayo se colocó en matraces de 250 ml, 200 ml del medio de agua residual sintética, se usó triplicado para los niveles del primer factor con un control negativo dando en total 7 matraces con medio ARS. Cada matraz se inoculó con 1 ml de su respectivo consorcio y se incubó a la temperatura establecida para el factor 2 en agitación continua de 100 rpm durante 7 días. Se hicieron tomas de muestras a las 4, 28, 77, 101 y 173 horas para medir DQO. Se repitió el ensayo con el consorcio más favorable. Para el segundo ensayo se utilizó diferentes concentraciones del consorcio repitiendo el mismo procedimiento del primer ensayo. Realizando el correspondiente análisis estadístico.

3 Resultados

3.1 Aislamiento y caracterización

De las 24 muestras seleccionadas en la expedición Antártica se obtuvo un total inicial de 170 aislados para el grupo A y 96 aislados para el grupo B, luego de sus respectivos aislamientos para cada grupo. Dichos aislados fueron sometidos a una bioprospección en medio sólido donde se logró reducir el número de aislados a un total de 131 aislados con actividad enzimática positiva para al menos un sustrato. Lo que correspondió al 49.24% del total de los aislados con potencial industrial, para poder reducir la cantidad de aislados se utilizó la fórmula de degradación del sustrato dando un total de 61 aislados con los mejores resultados. De estos aislados el 33.3% dio positivo para gelatinasa, el 23.4% para ureasa, el 18% para amilasa, el 12.6% para proteasa y el 12.6% para lipasa. Entre los mejores resultados se encontró el aislado A.10.5 o A21.5 [Tabla 1], este primer ensayo permitió diferenciar los aislados podían generar enzimas extracelulares de aquellos que producían enzimas intracelulares. Esto permitió descartar a estos últimos, que tenían menos eficiencia en comparación a los otros.

Tabla 2

Resultados de la prueba de halo de degradación de sustrato orgánico.

Aislado	Sustrato	halo	Colonia	Degradación
A5.9	Urea	9.00	2.780	Total
A21.5	Gelatina	4.587	1.287	3.300
A8.8	Proteína	3.167	1.126	2.041
A21.5	Urea	9.00	2.345	Total
A5.1	Gelatina	4.899	2.038	2.862
B9.1	Almidón	2.764	1.480	1.285
A10.5	Almidón	3.226	1.348	1.878

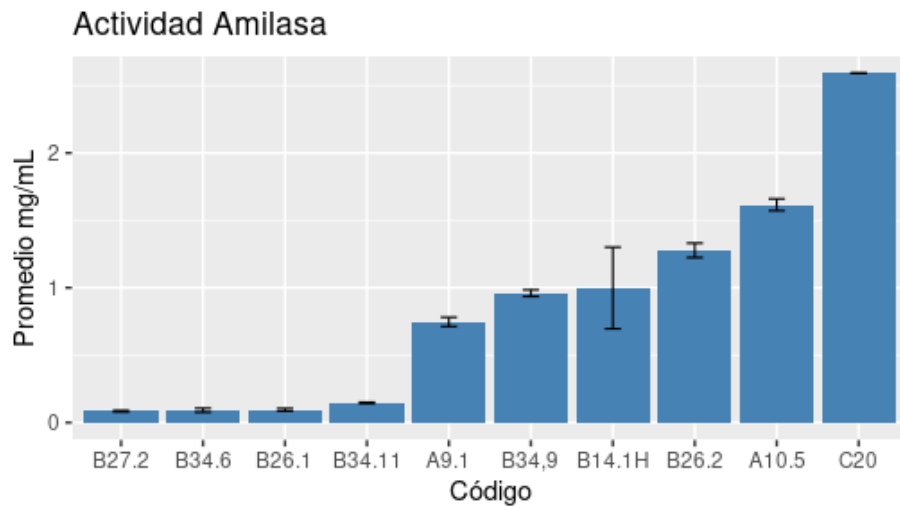
3.2 Cuantificación de actividad enzimática

Para este ensayo se redujo el grupo anterior de 61 a 32 aislados mediante el criterio de sustratos degradados > 1. Luego del periodo de incubación se realizó cada prueba en individual en duplicados o triplicados según los reactivos dispuestos para su posterior análisis estadístico. Dichos resultados mostraron que:

Para la enzima amilasa se realizaron varias cuantificaciones a diferentes temperaturas para comprobar la capacidad psicotolerante. Mostrando resultados prometedores a 15, 20, y 30 °C. La temperatura óptima fue 20 °C y la que marco la temperatura para el resto de los ensayos. Dentro de este ensayo se destacó que 5 aislados tuvieron resultados significativamente diferentes a los demás. Siendo los mejores aislados el A9.1, B34.9, B14.1, B26.2 y A10.5, este último con una actividad de 1.615 mg/mL y una desviación estándar de 0.04 mg/mL, seguido del aislado B26.2 con 1.277 mg/mL con una desviación estándar de 0.05 mg/mL [Ilustración 2]

Ilustración 2

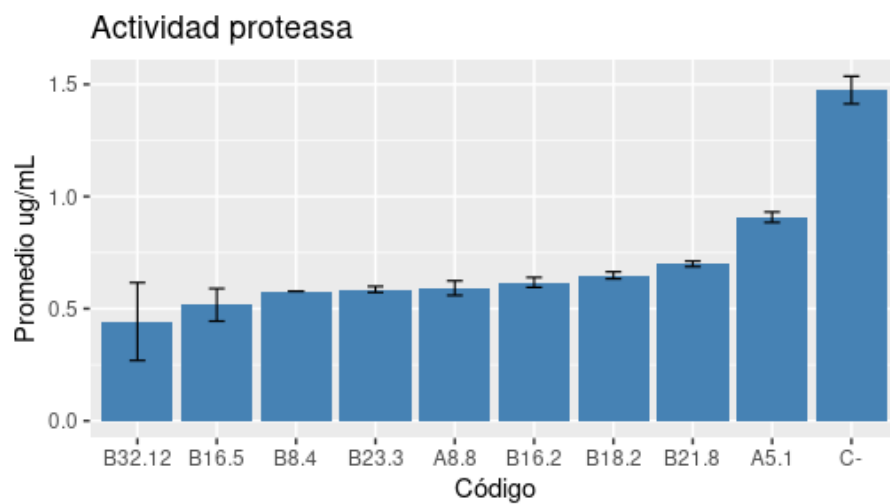
Resultados de la prueba cuantitativa para la enzima amilasa



Para la enzima proteasa se obtuvieron 9 aislados con un resultado distinguido en comparación a los otros aislados, resultados desde los 0.443 hasta los 0.908 ug/mL. El mejor lo tuvo el aislado A5.1 con 0.908 ug/mL con una desviación estándar de 0.02 ug/mL seguido de B21.8 con un resultado de 0.700 ug/mL y una desviación estándar de 0.01 ug/mL.

Ilustración 3

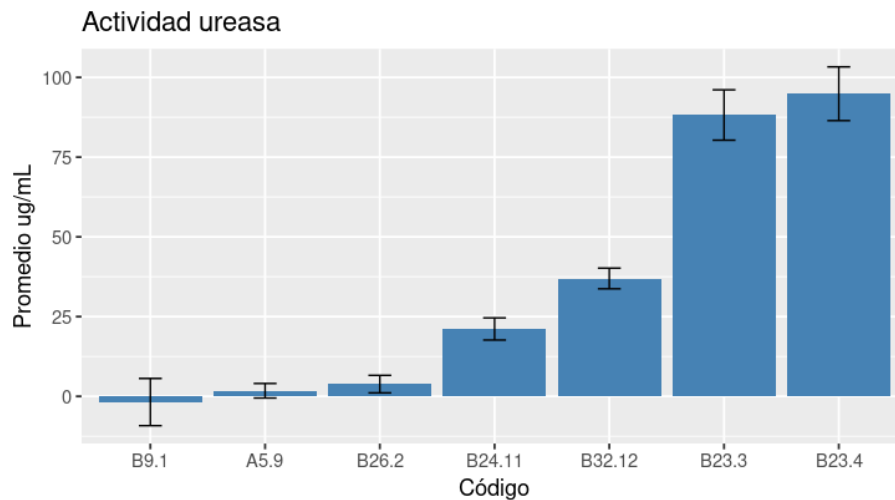
Resultados de la prueba cuantitativa para la enzima proteasa



Para la enzima ureasa se contó con 3 aislados que superan los 25 ug/mL con unos valores de 94.88 ug/mL para el aislado B23.4, 88.21 ug/mL para el aislado B23.3 y 36.96 ug/mL para el aislado B32.12. Dichos aislados tuvieron una desviación estándar de 8.43 ug/mL, 7.90 ug/mL y 3,24 ug/mL respectivamente.

Ilustración 4

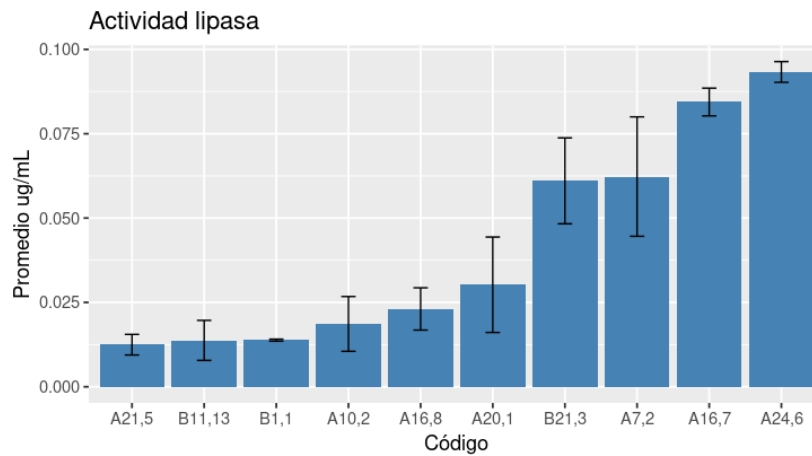
Resultados de la prueba cuantitativa para la enzima ureasa



Por último, para la enzima lipasa se obtuvo que 4 aislados pasaron los 0.05 ug/mL, 3 aislados del grupo A y uno del grupo B. El aislado con mayor actividad enzimática específica fue el A24.6 con 0.09 ug/mL, seguido de A16.7 con 0.08 ug/mL, A7.2 y B21.3 con 0.06 ug/mL. La desviación estándar para cada aislado fueron 0,003 ug/mL, 0.004 ug/mL, 0.01 ug/mL y 0.01 ug/mL respectivamente.

Ilustración 5

Resultados de la prueba cuantitativa para la enzima lipasa



Luego de los ensayos cuantitativos de actividades enzimáticas, se redujo el listado de aislados mediante el criterio de mejores resultados cuantitativos. Obteniendo la siguiente tabla donde se observaron 8 aislados [Tabla 2]. De esta tabla se usó el criterio de formación de consorcio, para formular 2 consorcios microbianos.

Tabla 3

Tabla general de resultados cualitativos y cuantitativos de los mejores aislados.

COD	Ensayo cualitativo					Ensayo cuantitativo					
	gelatinasa	amilasa	lipasa	proteasa	ureasa	Act. Enz.	amilasa 20c	amilasa 30c	lipasa	proteasa	ureasa
A24.6	**		**	*	*	4			119,33		
B26.2	*	*		*	*	4	1,28	1,453	16,11	3,83	
A10.5	**	**		*		3	1,62	0,257			
A5.1	**	**		*		3				0,908	
B23.1			*	*	*	3			26,11	0,586	88,21
B23.4	*		*		*	3			18,33		94,88
A16.7		**			*	2			66,67		
B14.1		*			*	2	1	1,032			

El primer consorcio microbiano estuvo compuesto de los aislados A24.6, B26.2, A10.5 y B23.1. El segundo consorcio microbiano está compuesto de los aislados A24.6, B26.2, A5.1 y B23.4. Dichos aislados fueron secuenciados por una empresa externa para su identificación molecular. Los resultados se muestran en la siguiente tabla [Tabla 3] donde se pudo comprobar que todos los microorganismos usados son bacterias, por lo que, los consorcios microbianos serán pasados a llamar consorcios bacterianos.

Tabla 4

Resultados de la identificación molecular mediante secuenciación de los mejores aislados.

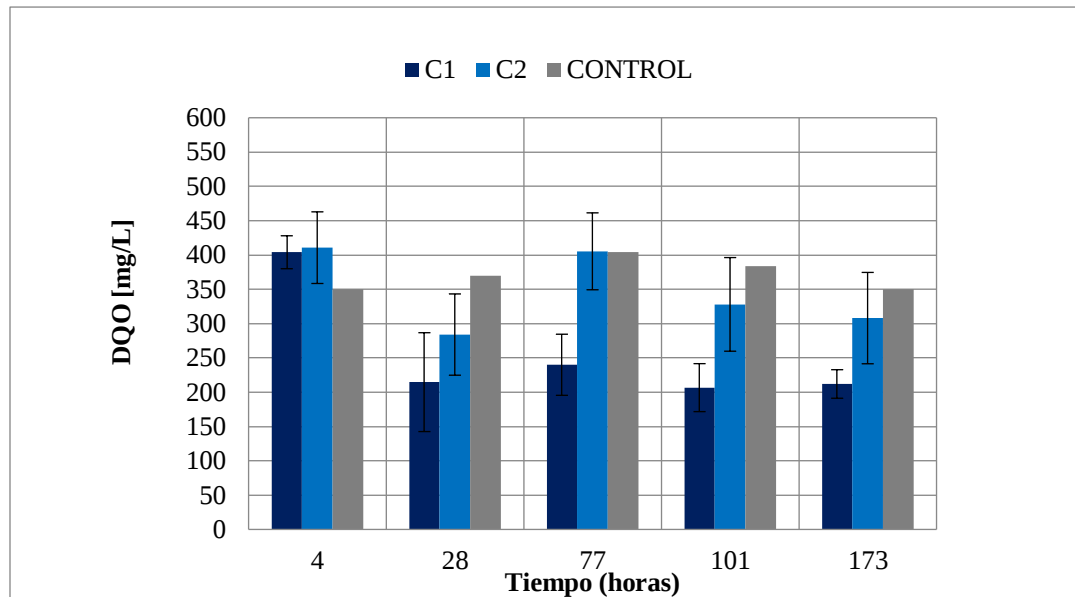
Código	Tamaño (nt)	Valor E	Organismo
A24.6	499	4E-172	<i>Serratia marcescens</i>
B26.2	1069	0.0	<i>Pseudomonas paralactis</i>
A10.5	1006	0.0	<i>Exiguobacterium antarcticum</i>
A5.1	952	0.0	<i>Serratia surfactantfaciens</i>
B23.1	1095	0.0	<i>Arthobacter sp.</i>
B23.4	1071	0.0	

3.3 Ensayo de degradación de aguas residuales

Los consorcios bacterianos establecidos anteriormente fueron usados en el primer ensayo donde obtuvimos que el primer consorcio presentó una mayor reducción del DQO con casi el 50% menos en un lapso de 173. Mientras que el consorcio 2 solo presentó una degradación del 25%, esto representó un rendimiento inicial doble para el primer consorcio en comparación al segundo ya que sus valores iniciales de DQO rondan los 400 mg/L.

Ilustración 6

Resultados del primer ensayo de reducción de DQO con los consorcios conformados.

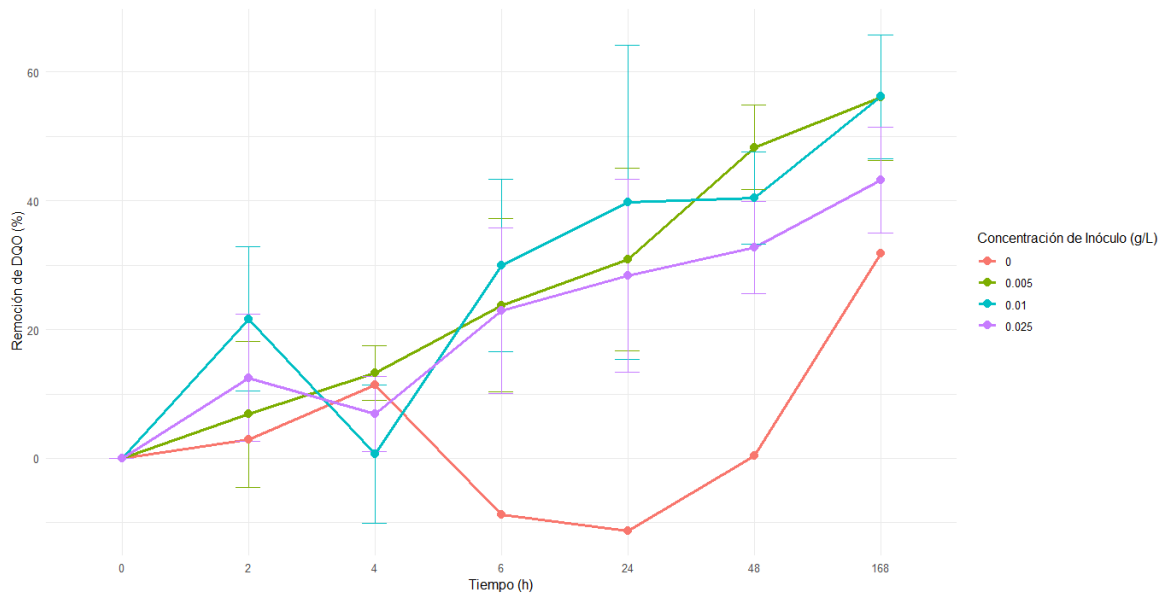


Se repitió el ensayo 2 veces solo con el consorcio 1 donde los resultados dieron una linealidad con el porcentaje de degradación de alrededor del 50% usando un inóculo de 1 ml a $OD_{600} = 1$ equivalente a una concentración de 0.01 g/L.

Para el segundo ensayo se usaron 3 diferentes concentraciones del consorcio 0.005, 0.01 y 0.025 g/L adicionalmente del control negativo. Este ensayo se realizó para determinar si la concentración del consorcio interfería con la reducción de DQO, todas las concentraciones dieron alrededor del 50% de reducción del DQO.

Ilustración 7

Resultados de reducción de DQO con diferentes concentraciones de consorcio



Para determinar si la diferencia de concentración es significativa se realizó un análisis estadístico ANOVA. Donde se pudo determinar que:

Tabla 5

Parámetros para el análisis estadístico

Prueba	Estadístico	Valor p	Conclusión
Shapiro-Wilk (Normalidad)	W = 0.9676	0.0668	Normalidad aceptada ($p > 0.05$)
Levene (Homogeneidad)	F = 0.46	0.9822	Varianzas homogéneas ($p > 0.05$)

El efecto de la concentración fue significativo ($p = \mathbf{0.000115}$, $p < 0.001$), lo que indica que los niveles de concentración afectan significativamente la respuesta. El efecto del tiempo fue significativo ($p = \mathbf{1.41e-12}$, $p < 0.001$), indicando una fuerte influencia del tiempo sobre la respuesta. Pero la interacción entre concentración y tiempo no fue significativa ($p = \mathbf{0.1309}$, $p > 0.05$), lo que sugiere que el efecto del tiempo no dependía significativamente de la concentración y viceversa [Tabla 6].

Tabla 6

Resultados del análisis estadístico de sus variables y sus combinaciones.

Fuente de Variación	GL (Df)	Sum Sq	Mean Sq	F	Valor p	Signif.
Concentración (g/L)	3	3117	1039.1	8.85	0.000115	***
Tiempo (h)	6	18093	3015.5	25.69	1.41e-12	***
Concentración × Tiempo (Inter.)	18	3212	178.4	1.52	0.1309	ns
Residuals	42	4929	117.4			

Además, A partir de las 6 horas, las diferencias respecto al tiempo 0 fueron significativas, con mayor remoción a 24, 48 y 168 horas, lo que comprueba el análisis estadístico anterior, pero las comparaciones entre tiempos cercanos no fueron significativas y las concentraciones de 0.005, 0.01 y 0.025 g/L muestran diferencias significativas respecto al blanco (0 g/L), pero no entre ellas, indicando que estas concentraciones aumentan significativamente el porcentaje de remoción. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de concentraciones positivas (0.005, 0.01, 0.025 g/L), lo que sugiere que el efecto del aumento de concentración podría estabilizarse en estos rangos.

Tabla 7

Resultados del análisis estadístico de la comparación de tiempos.

Factor	Comparación	p-valor	Significancia
Tiempo (h)	2-0	0.152	No significativa
	6-0	0.0008	Significativa
	24-0	0.00001	Significativa
	48-0	0.00000	Significativa
	168-0	0.00000	Significativa
Concentración (g/L)	0.005-0	0.00021	Significativa
	0.01-0	0.00008	Significativa
	0.025-0	0.00408	Significativa
	0.01-0.005	0.976	No significativa
	0.025-0.005	0.517	No significativa
	0.025-0.01	0.290	No significativa

4 Conclusiones

Este estudio demuestra el potencial de los ecosistemas antárticos como fuente de microorganismos con capacidades biotecnológicas para la biorremediación. Se lograron aislar una colección de 266 cepas bacterianas, de las cuales un 49.24% (131 cepas) muestran actividades enzimáticas positivas para al menos un sustrato orgánico. La estrategia utilizada, que pasa de un cribado cualitativo a uno cuantitativo, es fundamental para reducir el universo de estudio a 61 cepas con un rendimiento superior en la degradación de sustratos complejos a 15 °C.

La cuantificación de la actividad enzimática a 20 °C permite identificar cepas bacterianas con un rendimiento sobresaliente, destacando aislados como *Exiguobacterium antarcticum* por su alta actividad amilasa y *Serratia surfactantifaciens* por su notable actividad proteasa. La capacidad de estas cepas para producir enzimas eficientes a temperatura sub-óptimas para microorganismos mesófilos confirma su potencial para el tratamiento de efluentes en regiones frías, además de su potencial en regiones cálidas. Estos datos permiten diseñar y formular dos consorcios bacterianos. El primero (C1) está diseñado bajo un criterio de especialización funcional. El segundo (C2) se basa en la versatilidad de sus componentes.

La evaluación final en un modelo de agua residual sintética confirma el potencial biotecnológico de los consorcios formulados. El consorcio C1 demuestra ser significativamente más eficaz, logrando una remoción de la DQO cercana al 50% en un periodo de 168 horas, lo que representa el doble de rendimiento en comparación al consorcio C2. Este resultado resalta la importancia del diseño racional del consorcio. Además, el análisis estadístico revela que, si bien el tiempo es un factor crítico en la remoción, el aumento de la concentración del inóculo (entre 0.005 y 0.025 g/L) no genera diferencias significativas en el porcentaje final de degradación. Esto sugiere que el consorcio es eficiente y robusto incluso a bajas concentraciones, lo cual es una ventaja económica y operativa considerable para su aplicación a escala real.

5 Referencias Bibliográficas

- Abirami, B., Manigundan, K., Radhakrishnan, M., Gopikrishnan, V., Bhaskar, P. V., Shanmugasundaram, T., & Dastager, S. G. (2021). Diversity and Bioprospecting Potentials of Antarctic (Polar) Microbes. En *Microbiome-Host Interactions*. CRC Press.
- Al Mohaini, M., Farid, A., & Muzammal. (2022, febrero). *Enhancing Lipase Production of Bacillus salmalaya Strain 139SI Using Different Carbon Sources and Surfactants*.
<https://www.mdpi.com/2673-8007/2/1/17>
- Ayilara, M. S., & Babalola, O. O. (2023). Bioremediation of environmental wastes: The role of microorganisms. *Frontiers in Agronomy*, 5. <https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1183691>
- Bernfeld, P. (1955). [17] Amylases, α and β . En *Methods in Enzymology* (Vol. 1, pp. 149-158). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01021-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5)
- Camarena, F., Castro, J., Calderón, R., & Valdés, B. (2024). CLASIFICACIÓN DE CONTAMINANTES Y SU IMPACTO EN LA CALIDAD DEL AGUA DEL RÍO LA VILLA. *Centros: Revista Científica Universitaria*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.48204/j.centros.v13n1.a4633>
- Cao, Z., Yan, W., Ding, M., & Yuan, Y. (2022). Construction of microbial consortia for microbial degradation of complex compounds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1051233>
- Cecconet, D., Mainardis, M., Callegari, A., & Capodaglio, A. G. (2022). Psychrophilic treatment of municipal wastewater with a combined UASB/ASD system, and perspectives for improving urban WWTP sustainability. *Chemosphere*, 297, 134228. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134228>
- Danilovich, M. E., Sánchez, L. A., & Acosta, F. (2018, marzo). *Antarctic bioprospecting: In pursuit of microorganisms producing new antimicrobials and enzymes* | *Polar Biology*.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00300-018-2295-4>
- De KARIA, G. L., CHRISTIAN, R. A., & JARIWALA, NAMRATA, D. (2023). *WASTEWATER TREATMENT: CONCEPTS AND DESIGN APPROACH, THIRD EDITION*. PHI Learning Pvt. Ltd.
- Dextro, R. B., Andreote, A. P. D., Vaz, M. G. M. V., Carvalho, C. R., & Fiore, M. F. (2024). The pros and cons of axenic cultures in cyanobacterial research. *Algal Research*, 78, 103415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103415>
- Dziembowski, M., & Bialik, R. J. (2022). The Remotely and Directly Obtained Results of Glaciological Studies on King George Island: A Review. *Remote Sensing*, 14(12), 2736. <https://doi.org/10.3390/rs14122736>
- Esparza, J. (2021). CLASIFICACIÓN Y AFECTACIÓN POR RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS EN LA CIUDAD DE LA PLATA, BUENOS AIRES, ARGENTINA. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. <https://doi.org/10.20937/RICA.53758>
- Fernández, A. M. A., Arrieta, D. P., & Martínez, N. G. (2023). Biorremediación en Aguas Residuales Acuícolas: Una Revisión. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(4), 8538-8568. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i4.7577
- Guerrero, L., Montalvo, S., & Coronado, E. (2009, mayo). *Performance evaluation of a two-phase anaerobic digestion process of synthetic domestic wastewater at ambient temperature: Journal of Environmental Science and Health, Part A: Vol 44, No 7*.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10934520902847794>
- Hirani, N. V., Gajera, H., Hirpara, D. G., & Bhalara, R. (2022). *Microbiome characterization of PGPR isolated from Fusarium wilt infected cumin Rhizosphere*.

- Jantz, M. N., & Ruggerio, C. A. (2021). *Tratamiento de los residuos sólidos orgánicos domésticos como estrategia*.
- Kanekar, P. P., & Kanekar, S. P. (2022). Psychrophilic, Psychrotrophic, and Psychrotolerant Microorganisms. En P. P. Kanekar & S. P. Kanekar (Eds.), *Diversity and Biotechnology of Extremophilic Microorganisms from India* (pp. 215-249). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-19-1573-4_7
- Kaza, S., Yao, L. C., Bhada-Tata, P., & Van Woerden, F. (2018). *What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050* (Urban Development, p. 295). World Bank. <https://hdl.handle.net/10986/30317>
- Kim, D.-U., Khim, J. S., & Ahn, I.-Y. (2021, junio). *Patterns, drivers and implications of ascidian distributions in a rapidly deglaciating fjord, King George Island, West Antarctic Peninsula—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470160X21001321>
- Lakshmi, B. K. M., Sri, P. V. R., Devi, K. A., & Hemalatha, K. J. (2014). *Media optimization of protease production by Bacillus licheniformis and partial characterization of Alkaline protease*.
- Lapierre, F. M., Bolz, I., Büchs, J., & Huber, R. (2022). Developing a fluorometric urease activity microplate assay suitable for automated microbioreactor experiments. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 936759. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.936759>
- Leow, C. W., Fan, Y. V., Chua, L. S., Muhamad, I. I., Klemeš, J. J., & Lee, C. T. (2018). A Review on Application of Microorganisms for Organic Waste Management. *The Italian Association of Chemical Engineering*, 63. <https://doi.org/10.3303/CET1863015>
- Li, X., Wu, S., Dong, Y., Fan, H., Bai, Z., & Zhuang, X. (2021). Engineering Microbial Consortia towards Bioremediation. *Water*, 13(20), 2928. <https://doi.org/10.3390/w13202928>
- Liu, G., Xu, X., Zhu, L., Xing, S., & Chen, J. (2013). Biological nutrient removal in a continuous anaerobic-aerobic-anoxic process treating synthetic domestic wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 225, 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.01.098>
- Marchan-Solier, C. E., Zorrilla-Crespo, V. A., Cardenas-Quispe, M. A., & Pacheco, A. (2021). Contaminación por Residuos Sólidos Urbanos: Caso Comunidad de Occochaca, Huanta, Perú, 2021. *Scientific Research Journal CIDI*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.53942/srjcdi.v1i1.39>
- Mekonnen, E., Kebede, A., Nigussie, A., & Kebede. (2021, julio 10). *Isolation and Characterization of Urease-Producing Soil Bacteria—Mekonnen—2021—International Journal of Microbiology—Wiley Online Library*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2021/8888641>
- Mendoza, P. C., Mendoza, T. O. B., Barrios, I. C. C., & Velarde, R. A. N. (2021). Tratamiento de aguas residuales domesticas mediante reactor anaerobio para la reutilización del efluente en cultivos agrícolas. *Revista Alfa*, 5(14), 250-261. <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v5i14.114>
- Mittermeier, F., Bäumlér, M., Arulrajah, P., García Lima, J. de J., Hauke, S., Stock, A., & Weuster-Botz, D. (2023). Artificial microbial consortia for bioproduction processes. *Engineering in Life Sciences*, 23(1), e2100152. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100152>
- Morales-Mejía, J. C., Vargas-Martínez, M. G., & Camps, J. M. (2021). La demanda química de oxígeno con el procedimiento APHA/AWWA/WEF 5220 D para rango alto adaptado a microescala. *Tecnología y ciencias del agua*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.24850/j-tyca-2021-01-04>
- Oblitas Abanto, D. L. (2022). Eficiencia de remoción de demanda bioquímica de oxígeno y demanda química de oxígeno en un sistema tanque séptico más filtro percolador. *Universidad Nacional de Cajamarca*. <http://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/5306>
- Pulschen, A. A., Bendia, A. G., Fricker, A. D., Pellizari, V. H., Galante, D., & Rodrigues, F. (2017). Isolation of Uncultured Bacteria from Antarctica Using Long Incubation Periods and Low Nutritional Media. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01346>
- Ramalho, R. S. (2021). *Tratamiento de aguas residuales*. Reverte.

- Ramírez Jiménez, D. F. (2021). Sistema de medición y control de temperatura para un prototipo de planta de tratamiento de aguas residuales. *Investigación e Innovación en Ingenierías*, 9(1 (Enero-Junio)), 100-113.
- Rapuano, R., & Graziano, G. (2022, octubre 6). *Some Clues about Enzymes from Psychrophilic Microorganisms*. <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/6/1161>
- Rodríguez Guerra, A., & Baca Cajas, K. A. (2022). Generación de Residuos Sólidos Urbanos (RSU): Análisis de una década de gestión en países de Europa y América. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas: REMCB*, 43(1 (Mayo)), 49-61.
- Rodríguez-Gonzales, A., Zárate-Villarroe, S. G., Bastida-Codina, A., Rodríguez-Gonzales, A., Zárate-Villarroe, S. G., & Bastida-Codina, A. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Revista de Ciencias Ambientales*, 56(1), 178-208. <https://doi.org/10.15359/rca.56/1.9>
- Saeed, M. U., Hussain, N., Sumrin, A., Shahbaz, A., Noor, S., Bilal, M., Aleya, L., & Iqbal, H. M. N. (2022). Microbial bioremediation strategies with wastewater treatment potentialities – A review. *Science of The Total Environment*, 818, 151754. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151754>
- Salinas, J., Carpena, V., Martínez-Gallardo, M. R., Segado, M., Estrella-González, M. J., Toribio, A. J., Jurado, M. M., López-González, J. A., Suárez-Estrella, F., & López, M. J. (2023). Development of plastic-degrading microbial consortia by induced selection in microcosms. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1143769>
- Salwan, R., Sharma, V., Kasana, R. C., & Gulati, A. (2020). Bioprospecting Psychrotrophic Bacteria for Serine-Type Proteases from the Cold Areas of Western Himalayas. *Current Microbiology*, 77(5), 795-806. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01876-w>
- Sarsan, S., Pandiyan, A., Rodhe, A. V., & Jagavati, S. (2021). Synergistic Interactions Among Microbial Communities. En R. P. Singh, G. Manchanda, K. Bhattacharjee, & H. Panosyan (Eds.), *Microbes in Microbial Communities: Ecological and Applied Perspectives* (pp. 1-37). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5617-0_1
- Shen, L., Zhang, S., & Chen, G. (2021). Regulated strategies of cold-adapted microorganisms in response to cold: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(48), 68006-68024. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16843-6>
- Tauzene Afonso Matangue, M., Candian Ferreira, L., Sánchez Ortiz, I. A., Tauzene Afonso Matangue, M., Candian Ferreira, L., & Sánchez Ortiz, I. A. (2018). Evaluación cuantitativa de riesgo microbiano para consumidores de culturas irrigadas con aguas residuales de la PTAR de Ilha Solteira (SP). *Ingeniería y Desarrollo*, 36(2), 359-377. <https://doi.org/10.14482/inde.36.2.10322>
- Tran, N. H., Ngo, H. H., Urase, T., & Gin, K. Y.-H. (2015). A critical review on characterization strategies of organic matter for wastewater and water treatment processes. *Bioresource Technology*, 193, 523-533. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.091>
- Tripathi, N., & Sapra, A. (2020). *Gram staining*. <https://europepmc.org/books/nbk562156>
- Younis Ahmad, H., Rajesh, K., & Ajay, K. (2023). Environmental waste management strategies and vermi transformation for sustainable development. *ELSEVIER*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2023.100747>