

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Degradación de grasas por acción de microorganismos aislados de la Antártida y de un consorcio de *Bacillus* spp.

Proyecto Integrador

Previo a la obtención del título de:

Bióloga

Presentado por:

Nicole Vanessa López Ponce

Gabriela Antonella Torres Martínez

Guayaquil – Ecuador

Año: 2023

Dedicatoria

A Dios.

A mis papás, Marianela y José, por acompañarme en la vida.

A mi hermana, por siempre estar.

A mis sobrinos, por mejorar mis días.

A quien siempre me apoyó.

A mis amigos.

A mí.

Gabriela Torres Martínez

A mi mamá, quien fue mi apoyo incondicional.

A mi papá, quien me ha ayudado durante mi formación profesional.

A mis hermanas, quienes me motivan día a día.

A mis amigos.

A mis profesores.

Nicole López Ponce

Agradecimientos

Nuestro más sincero agradecimiento a todas las personas que nos apoyaron e hicieron posible este proyecto. Especialmente a nuestra tutora, la PhD Nardy del Valle Diez, al Ing. Jeffrey Vargas y al biólogo Galo Gutiérrez. También le damos las gracias al CIBE y a la ESPOL por brindarnos sus instalaciones y recursos, dándonos la oportunidad de continuar aprendiendo y de alcanzar nuestras metas.

Declaración Expresa

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Nicole Vanessa López Ponce y Gabriela Antonella Torres Martínez y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

Guayaquil, 9 de septiembre de 2023.

Nicole López Ponce
Autora de Proyecto Integrador

Gabriela Torres Martínez
Autora de Proyecto Integrador

Evaluadores

Diego Gallardo, MSc.
Profesor de Materia Integradora

Nardy del Valle Diez, PhD
Tutora del Proyecto Integrador

Resumen

La acumulación de grasas en el sistema de saneamiento es un problema común, ya que causa daños en el medio ambiente, en la salud pública y en el sistema de tratamiento de aguas residuales. Actualmente, las trampas de grasa son utilizadas para recolectar grasas y aceites provenientes de las aguas residuales. Este trabajo tiene como objetivo evaluar comparativamente la capacidad de degradación de grasas por acción de las enzimas lipasas de microorganismos de la Antártida y de un consorcio de *Bacillus* spp. para su potencial aplicación en trampas de grasa. De esta manera, el uso de microorganismos extremófilos puede ser la respuesta al saneamiento de trampas de grasa. Para aquello, se determinaron las cepas de la Antártida con mejor actividad lipolítica (24.6 y 16.7) y posteriormente se caracterizaron fenotípicamente. Después se evaluó comparativamente la estabilidad de las bacterias y del consorcio frente a variaciones de pH y de temperaturas, y a la desnaturalización por calor. Las dos cepas de la Antártida superaron la actividad lipolítica del consorcio. Este proyecto demuestra la capacidad de degradación de lípidos que poseen las enzimas provenientes de bacterias antárticas y su posible aplicación en trampas de grasa, sin embargo, es necesario realizar pruebas *in situ*.

Palabras clave: Antártida, enzimas, actividad lipolítica, estabilidad enzimática

Abstract

The accumulation of grease in the sanitation system is a common problem, since it causes damage to the environment, public health, and the wastewater treatment system. Currently, grease traps are used to collect fats and oils from wastewater. The objective of this work is to comparatively evaluate the capacity for fat degradation by the action of lipase enzymes of microorganisms from Antarctica and a consortium of *Bacillus* spp. for its potential application in grease traps. Thus, the use of extremophile microorganisms may be the answer to grease trap sanitation. For that, the strains from Antarctica with the best lipolytic activity (24.6 and 16.7) were determined and subsequently phenotypically characterized. Then, the stability of the bacteria and the consortium against pH and temperature variations, and heat denaturation, was evaluated comparatively. The two strains from Antarctica exceeded the lipolytic activity of the consortium. This project demonstrates the lipid degradation capacity of enzymes from Antarctic bacteria and their possible application in grease traps, however, it is necessary to carry out tests *in situ*.

Keywords: Antarctica, enzymes, lipolytic activity, enzyme stability

Índice general

Resumen	I
Abstract	II
Índice general.....	III
Abreviaturas	VI
Simbología	VII
Índice de figuras.....	VIII
Índice de tablas	IX
Capítulo 1	1
1.1 Introducción.....	2
1.2 Descripción del problema	3
1.3 Justificación.....	4
1.4 Objetivos.....	5
1.4.1 Objetivo general.....	5
1.4.2 Objetivos específicos	5
1.5 Marco teórico.....	5
1.5.1 Grasas y aceites como agentes contaminantes de aguas residuales.....	5
1.5.2 Trampas de grasa	6
1.5.3 Bioprospección y biorremediación utilizando microorganismos	7
1.5.4 Productos comerciales utilizados en la degradación de grasas	7
1.5.5 Microorganismos de la Antártida	8
1.5.6 Enzima lipasa.....	8
Capítulo 2	10

2.1	Metodología.....	11
2.1.1	Población de estudio y muestra	11
2.1.2	Medio de cultivo y condiciones de cultivo	11
2.1.3	Discriminación de las bacterias de la Antártida con mejor actividad lipolítica	11
2.1.3.1	Medición de la densidad óptica de los microorganismos.....	11
2.1.3.2	Extracción de la lipasa cruda	12
2.1.3.3	Titulación de la lipasa.....	12
2.1.3.4	Determinación de la actividad lipolítica	13
2.1.4	Caracterización fenotípica	13
2.1.5	Ensayo cualitativo de la actividad lipolítica	14
2.1.6	Criterio de selección para las pruebas de estabilidad	14
2.1.7	Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica.....	15
2.1.6.1	Estabilidad de la actividad lipolítica frente a variación del pH	15
2.1.6.2	Estabilidad de la actividad lipolítica frente a distintas temperaturas.....	15
2.1.6.3	Estabilidad de la actividad lipolítica frente a una temperatura de ebullición	16
Capítulo 3	17
3.1	Resultados y análisis	18
3.1.1	Microorganismos seleccionados.....	18
3.1.2	Fenotipo de los microorganismos de la Antártida seleccionados	21

3.1.3	Evaluación cualitativa de la actividad lipolítica	22
3.1.4	Criterio de selección para las pruebas de estabilidad.....	23
3.1.5	Influencia del pH en la actividad lipolítica	25
3.1.6	Influencia de distintas temperaturas en la actividad lipolítica	28
3.1.7	Influencia de una temperatura de ebullición en la actividad lipolítica	31
Capítulo 4	34
4.1	Conclusiones y recomendaciones	35
4.1.1	Conclusiones.....	35
4.1.2	Recomendaciones	35
Referencias	36

Abreviaturas

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
EPA	Agencia Ambiental Estadounidense
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
ONU	Organización de las Naciones Unidas

Simbología

g	Gramo
mg	Miligramo
ml	Mililitro
°C	Grados centígrados
rpm	Revoluciones por minuto
spp.	Varias especies
nm	Nanómetro
U/ml	Unidades por mililitro
ul	Microlitro
h	Hora
LB	Luria Bertani

Índice de figuras

Figura 3.1	18
Figura 3.2	21
Figura 3.3	22
Figura 3.4	23
Figura 3.5	24
Figura 3.6	25
Figura 3.7	27
Figura 3.8	27
Figura 3.9	28
Figura 3.10	29
Figura 3.11	30
Figura 3.12	30
Figura 3.13	32
Figura 3.14	33
Figura 3.15	33

Índice de tablas

Tabla 3.1	19
Tabla 3.2	20

Capítulo 1

1.1 Introducción

La eliminación de grasas y aceites presentes en aguas residuales es crítica para asegurar la eficiencia del sistema de recolección de éstas, ya que evita el bloqueo de alcantarillas, al igual que posibles problemas en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Tang et al., 2012). La Agencia Ambiental Estadounidense (EPA) estima que entre 10,350-36,000 desbordamientos por bloqueos de alcantarillas ocurren anualmente en Estados Unidos, de los cuales el 47% están relacionados a grasas y aceites. Asimismo, en Reino Unido ocurren más de 25,000 inundaciones al año y el 50% de las obstrucciones de alcantarillado también se deben a las aguas residuales no tratadas con grasas y aceites (Husain et al., 2014). Según el informe de Agua Potable y Alcantarillado, en el año 2016 sólo el 29,3% de las aguas residuales fueron tratadas antes de ingresar a las alcantarillas (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2016). Por este motivo, se utilizan trampas de grasa en restaurantes y establecimientos industriales que requieren aceites y grasas para llevar a cabo sus procesos productivos, las cuales, son bóvedas que permiten que las aguas residuales del establecimiento se enfríen y que las grasas suban a la superficie para su fácil remoción. Debido a esto, se ha implementado el uso de bioaditivos comerciales para el tratamiento de grasas y aceites en trampas de grasa, los cuales, mediante la degradación de lípidos, han demostrado reducir los bloqueos en el sistema de alcantarillado, así como también aliviar la carga en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Los bioaditivos poseen un enfoque ambientalmente deseable, y están constituidos por microorganismos o sus enzimas, principalmente lipasa, que es la enzima más importante para la hidrólisis de grasas (Tzirita et al., 2021).

El consorcio comercial utilizado en este estudio está conformado por bacterias del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, y *B. pumilus*). El género *Bacillus* es extensamente utilizado para fines asociados con la degradación de lípidos ya que incluye especies productoras de lipasas y biosurfactantes. Además, las bacterias pertenecientes a este

género producen endoesporas que les brindan resistencia a condiciones ambientales adversas (He et al., 2016).

Por otro lado, las bacterias de la Antártida al ser extremófilas poseen características con gran potencial biotecnológico. Esto debido a que sus enzimas son capaces de resistir diversas condiciones como estabilidad a diferentes temperaturas y a un amplio rango de pH. Entre las principales enzimas que producen las bacterias extremófilas, están las lipasas, las cuales son de interés central para este estudio (Espitia-Arias, 2010).

1.2 Descripción del problema

Las aguas residuales provenientes de restaurantes y establecimientos industriales poseen grasas y aceites que pueden ocasionar graves problemas a la red de alcantarillado y al sistema de tratamiento de aguas residuales, así como también a los ecosistemas y a la salud humana. Esto representa un grave problema económico debido a que las grasas y aceites se solidifican y bloquean las tuberías del sistema de alcantarillado, ocasionando inundaciones y malos olores en urbes debido a la propagación de microorganismos en las tuberías. Como resultado, es necesario realizar mantenimientos de manera más seguida a las tuberías e incluso reemplazarlas (Tang et al., 2012).

En caso de que las grasas y aceites logren llegar hasta las plantas de tratamiento de aguas residuales, éstos representan grandes cargas adicionales de sólidos suspendidos totales (SST), y un alza en la demanda biológica de oxígeno (DBO). Adicionalmente, las grasas tienen efectos adversos en los procesos biológicos de las plantas de tratamiento de aguas residuales ya que se forman películas lipídicas que impiden la transferencia de oxígeno a la biomasa (Tang et al., 2012).

Por otro lado, la alta concentración de aceites y grasas en las aguas residuales no tratadas que llegan a cuerpos de agua, afectan a los ecosistemas acuáticos, debido a que

generan una disminución en los niveles de oxígeno que imposibilita la existencia de organismos acuáticos. Además, pueden llegar a ocasionar la acidificación de los cuerpos de agua, obstaculizar la penetración de la luz solar y evitar el intercambio de gases entre la atmósfera y el agua (Chinchilla Barrantes et al., 2016). Asimismo, pueden causar problemas en la salud humana dado a que algunas comunidades se abastecen de agua a través de aguas superficiales, y si las mismas se encuentran contaminadas puedan dar lugar a enfermedades causadas por patógenos (Centeno Calderón, 2019).

1.3 Justificación

El tratamiento de aguas residuales que poseen grasas y aceites se puede realizar mediante operaciones físicas, como la adsorción de lípidos utilizando telas o el uso de desnatadores de aceite, y químicas. Los métodos químicos son costosos y utilizan sustancias tóxicas, como el ácido sulfúrico y el hidróxido de sodio, que generan daños en la biota microbiana presente durante los procesos para el tratamiento de aguas residuales (Lauprasert et al., 2017). Debido a aquello, se han implementado técnicas de biorremediación como el uso de microorganismos con actividad lipolítica dado a que ayudan a degradar los residuos de aceites y grasas, convirtiéndolos en dióxido de carbono, agua y biomasa (Bhumibhamon & Phattayakorn, 2003). Además, es una solución eficaz, segura, económica y de fácil administración.

El uso de bacterias extremófilas y de consorcios microbianos comerciales para la degradación de aceites y grasas, por acción de las enzimas lipasas, en trampas de grasa y consecuentemente en las aguas residuales ayudará a cumplir los siguientes Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) dispuestos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU): Salud y Bienestar (ODS N° 3); Agua Limpia y Saneamiento (ODS N° 6); y Vida Submarina (ODS N° 14) (Naciones Unidas, 2018).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar comparativamente la capacidad de degradación de grasas por acción de las enzimas lipasas de microorganismos de la Antártida y de un consorcio de *Bacillus* spp., para su potencial aplicación en trampas de grasa.

1.4.2 Objetivos específicos

- Inducir la producción de la actividad lipasa por microorganismos de la Antártida y por el consorcio comercial de *Bacillus* spp.
- Valorar la actividad enzimática de lipasas presentes en microorganismos de la Antártida y en un consorcio comercial que contiene *Bacillus* spp. por medio de análisis cualitativos y cuantitativos.
- Comparar la capacidad de degradación de grasas de los microorganismos de la Antártida y del consorcio comercial de *Bacillus* spp.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Grasas y aceites como agentes contaminantes de aguas residuales

Los lípidos constituyen la construcción de todas las células y participan en varios procesos biológicos; estas biomoléculas se caracterizan por su solubilidad en disolventes orgánicos e insolubilidad en medios acuosos. Los triglicéridos forman parte del 99% de los lípidos que se encuentran en la naturaleza, los cuales pueden provenir de origen vegetal o animal, y comúnmente se los conocen como grasas y aceites (Sánchez, 2018). Por lo general, las grasas poseen una textura sólida a temperatura ambiente mientras que los aceites se encuentran en estado líquido. Los triglicéridos están conformados principalmente por glicerol y tres ácidos grasos (Gurr et al., 2016).

Entre los principales contaminantes de los cuerpos de agua están las grasas y los aceites, al poseer enlaces químicos difíciles de romper o degradar generan dificultades en el manejo y en el tratamiento de aguas residuales (Sánchez, 2018). La alta concentración de estos compuestos causa dificultades en los procesos biológicos del tratamiento de aguas residuales; debido a su naturaleza, la acumulación de grasas y aceites forman una capa en la superficie de las aguas y disminuyen la tasa de transferencia de oxígeno en el proceso aeróbico (Bhumibhamon et al., 2002). Además, la deposición de grasas está influenciada por factores como ácidos grasos libres, pH y temperatura, siendo estos dos últimos en conjunto con iones de calcio, quienes afectan directamente la tasa de producción de sólidos saponificados, lo cual crea bloqueos en las alcantarillas que transportan aguas residuales (Sultana et al., 2022). Por aquel motivo se realizan procedimientos primarios y secundarios, los cuales pueden ser físicos o químicos, de pretratamiento en las aguas residuales para remover las grasas y aceites presentes en ellas (Sánchez, 2018).

1.5.2 Trampas de grasa

Las trampas de grasa se consideran como parte de los procedimientos primarios y secundarios para el pretratamiento de aguas residuales que contienen sólidos, grasas y aceites. Estos equipos están conformados por tres cámaras; una de ellas da paso a las aguas residuales, mientras que otra permite la salida, y la cámara intermedia es en donde ocurren los procesos de separación de grasas y aceites. Adicionalmente, se suelen agregar bacterias no patógenas con actividad enzimática lipolítica con el objetivo de degradar las aceites y grasas, e incluso eliminar los malos olores (Sánchez, 2018). Las industrias alimentarias y los restaurantes hacen uso de las trampas de grasa para interceptar las grasas y aceites antes de que ingresen al sistema de tratamiento de aguas residuales y puedan causar problemas en el alcantarillado o en el medio ambiente (Lauprasert et al., 2017).

1.5.3 Bioprospección y biorremediación utilizando microorganismos

La bioprospección se define como la búsqueda de componentes que se pueden encontrar en el medio ambiente y de organismos para darles un valor comercial a través del desarrollo de productos con interés económico (Artuso, 2002). Los procesos de biorremediación, los cuales aprovechan la actividad metabólica de los microorganismos, son aprovechados para eliminar o degradar contaminantes de una manera sustentable y menos costosa (Windevoixhel et al., 2011). Los microorganismos extremófilos son muy estudiados dado a su amplio rango de aplicaciones en la biotecnología (Reed, 2005).

Junto a la biorremediación, la bioaumentación es una técnica biotecnológica que se basa en el crecimiento de microbiota capaz de remover compuestos contaminantes del agua. Este es un proceso atractivo ya que además de romper los lípidos y liberar ácidos grasos y glicerol por medio de la actividad de la enzima lipasa, también asimila los ácidos grasos liberados en dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) a través del proceso de β -oxidación (Tzirita et al., 2018).

1.5.4 Productos comerciales utilizados en la degradación de grasas

Actualmente existen productos comerciales creados a partir de microorganismos, utilizados para la degradación de grasas, principalmente en trampas de grasa industriales o presentes en restaurantes. El género *Bacillus* es considerablemente significativo en la biodegradación de grasas, ya que incluye importantes especies productoras de lipasas y biosurfactantes, siendo *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus lincheniformis* ampliamente estudiadas. Esto debido a que secretan una gran cantidad de enzimas (20-25 g/l), lo cual es de relevancia industrial (Tzirita et al., 2018). Cabe mencionar que, la capacidad degradadora de un inóculo microbiano es generalmente mayor a la de las cepas puras que lo conforman, debido a las actividades cooperativas que producen los microorganismos. Además, los miembros de este género producen endosporas que les proveen de resistencia frente a

condiciones medioambientales adversas, por lo que han sido ampliamente utilizados como suplementos aditivos en biodegradación (Tzirita et al., 2019).

1.5.5 *Microorganismos de la Antártida*

Durante mucho tiempo la Antártida permaneció prácticamente inexplorada debido a sus condiciones extremas, las cuales dificultan el acceso. No obstante, recientemente han aumentado significativamente las investigaciones sobre bioprospección y biodiversidad de microorganismos de la Antártida. El motivo de esto es que los microorganismos antárticos han evolucionado sus estrategias de supervivencia para lograr resistir condiciones abióticas extremas como frío, alta salinidad, e incidencia de luz ultravioleta. Como consecuencia, las enzimas extremófilas producidas por estos microorganismos son de interés para aplicaciones biotecnológicas, ya que poseen una mayor estabilidad frente a condiciones adversas (Correa & Abreu, 2020). Esto debido a que todos los componentes celulares, el metabolismo y la síntesis de proteínas están adaptados a funcionar eficientemente a bajas temperaturas, lo cual permite un alto nivel de flexibilidad en la estructura de las proteínas, manteniendo el sitio activo, una alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas, y una baja energía de activación (Salwoom et al., 2019).

1.5.6 *Enzima lipasa*

La lipasa es un tipo de enzima perteneciente a la clase triacilglicerol hidrolasa. Esta es definida como una carboxilesterasa, la cual cataliza la hidrólisis y síntesis de acilglicérols de cadena larga, liberando ácidos grasos libres, diacilglicérols, monoacilglicérols y glicérol (Parra et al., 2015).

La capacidad de las lipasas para catalizar reacciones en una gran variedad de sustratos y su estabilidad en solventes orgánicos, las convierte en el tercer grupo de enzimas más comercializadas internacionalmente después de las carbohidrasas y proteasas (Lee et al., 2015).

Recientemente se ha incrementado la demanda global de lipasas debido a sus aplicaciones industriales, entre las que se encuentra la biorremediación ambiental. Esto debido a que representa una alternativa al uso de productos químicos que pueden ser peligrosos. Por tal razón, las lipasas constituyen una tecnología verde y sostenible (Nimkande et al., 2023).

Las lipasas provenientes de microorganismos son comparativamente más estables en condiciones adversas y su producción es más fácil y menos costosa que la de las lipasas obtenidas de plantas y animales (Alves et al., 2021). Debido a su versatilidad en las aplicaciones biotecnológicas, las lipasas provenientes de bacterias continúan siendo estudiadas para la biodegradación de grasas y aceites (Lee et al., 2015).

Capítulo 2

2.1 Metodología

2.1.1 Población de estudio y muestra

Los 11 microorganismos de la Antártida utilizados en este proyecto fueron recolectados durante el mes de enero de 2023, en la XXVI Expedición Antártica Ecuatoriana. Las muestras de las cuales se aislaron a los microorganismos corresponden a materia orgánica proveniente de la Isla Rey Jorge.

Por otro lado, el consorcio comercial utilizado en este proyecto está compuesto por cuatro bacterias del género *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, y *Bacillus pumilus*).

2.1.2 Medio de cultivo y condiciones de cultivo

El medio utilizado para el crecimiento de los microorganismos fue el caldo Luria Bertani (LB) de Invitrogen junto con aceite de oliva, el cual sirvió de sustrato. El medio fue ajustado a un pH de 7.2 usando 0.5N NaOH y luego fue esterilizado en el autoclave durante 20 minutos a 121°C. Cada microorganismo fue inoculado en 100ml de LB + 4ml de aceite de oliva. Los controles consistieron en 100ml de LB sin sustrato y en 100ml de LB con sustrato. Con respecto a las bacterias de la Antártida, estas fueron incubadas a temperatura ambiente (22.5°C), ya que no se contaba con un rotary shaker que refrigerara, a 150 rpm para asegurar la aireación del caldo. Por otro lado, el consorcio comercial de *Bacillus* spp. fue incubado a 37°C a 150 rpm. Los agitadores orbitales utilizados fueron Innova 40 (New Brunswick Scientific) y Shaking incubator (HYSC) (Al Mohaini et al., 2022).

2.1.3 Discriminación de las bacterias de la Antártida con mejor actividad lipolítica

2.1.3.1 Medición de la densidad óptica de los microorganismos. Esto fue medido utilizando un espectrofotómetro Synergy HT (BioTek) a una densidad óptica de 600nm. Para cada medición se colocaron 100ul de cada microorganismo en medio LB,

así como de los dos controles, en microplacas de 96 pocillos. Las mediciones fueron realizadas por triplicado a las 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, y 96 h. Además, se colocaron controles de LB y de LB + aceite (Al Mohaini et al., 2022).

2.1.3.2 Extracción de la lipasa cruda Los microorganismos de la Antártida y el consorcio comercial fueron centrifugados después de las 96 h de incubación para la obtención de la enzima lipasa. La centrifugación fue realizada durante 20 minutos a 8000 rpm y a 4°C en una Centrifuge 5810 R (Eppendorf). El sobrenadante que se obtuvo contenía la lipasa cruda extracelular (Al Mohaini et al., 2022).

2.1.3.3 Titulación de la lipasa. Para la titulación de la enzima lipasa cruda, se preparó una emulsión utilizando 10% aceite de oliva, el cual sirve como sustrato, 10% (p/v) de goma arábica, 0.6% de CaCl₂ y 10% de buffer fosfato de sodio; el volumen faltante se completó con agua destilada. Para cada titulación se utilizaron 2.25ml de emulsión y 0.25ml de la lipasa cruda. Esto fue incubado durante 1 h a 150rpm y a temperatura ambiente (22.5°C) para el caso de las bacterias de la Antártida, y a 37°C en el caso del consorcio comercial. Los rotary shaker utilizados fueron Innova 40 (New Brunswick Scientific) y Shaking incubator (HYSC). Luego de la incubación, se interrumpió la reacción agregando 3.75ml de una solución de acetona:etanol (1:1) al 100%. Después se agregó 22.5ul de fenolftaleína al 1% como indicador y se titularon las muestras con 0.05M NaOH hasta que sus tonalidades cambien a rosa claro. Un agitador magnético Color Squid (IKA Works) fue utilizado para agitar las mezclas. Los blancos se realizaron de la misma manera, con la única diferencia de que la lipasa cruda se agregó después de la solución de acetona y etanol. Las titulaciones se llevaron a cabo en tres repeticiones (Al Mohaini et al., 2022).

2.1.3.4 Determinación de la actividad lipolítica. Se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo de la actividad lipolítica de las bacterias de la Antártida y del consorcio comercial:

$$\textit{Actividad lipolítica} = \frac{(V_S - V_B) \times N \times 1000}{S} \quad (2.1)$$

En donde, V_S es el volumen de la solución de NaOH empleada durante la titulación de cada cóctel enzima-sustrato; V_B es el volumen de la solución de NaOH utilizado durante la titulación de los blancos; N es la molaridad de la solución de NaOH; y, S es el volumen del sustrato utilizado en la emulsión. Las unidades de la actividad lipolítica son U/ml, donde U es la cantidad necesaria de lipasa para liberar 1 mol de ácidos grasos de los triglicéridos.

También se realizó la cuantificación de las proteínas de las bacterias de la Antártida y del consorcio comercial. La medición se la realizó utilizando un espectrofotómetro Synergy HT (BioTek) a una absorbancia de 595nm. Para cada medición se colocaron 10ul de cada muestra y 200ul de reactivo de Bradford al 1X en microplacas de 96 pocillos. Las mediciones fueron realizadas por duplicado a las 96 h. A partir de la actividad lipolítica y la cuantificación de proteínas, fue posible conocer la actividad enzimática específica de cada microorganismo (Al Mohaini et al., 2022).

2.1.4 Caracterización fenotípica

Para la identificación morfológica de las dos bacterias de la Antártida con mejor actividad lipolítica se realizaron tinciones de Gram. Las muestras fueron observadas en un microscopio Axioskop 2 plus (Zeiss) con el objetivo 100X. También se realizó una identificación macroscópica,

para ello se sembraron las bacterias en agar Nutritivo (Sigma Aldrich) y se las incubó por 5 días a 16°C en una incubadora Precision (Thermo Scientific). De acuerdo a la caracterización se seleccionaron dos de las tres bacterias de la Antártida para realizar los ensayos descritos en 2.1.5, 2.1.6, y 2.1.7.

2.1.5 Ensayo cualitativo de la actividad lipolítica

Para evaluar cualitativamente la actividad lipolítica de las bacterias de la Antártida seleccionadas en el punto 2.1.4 y del consorcio comercial, se prepararon placas con Tween 20 agar. El medio fue esterilizado en el autoclave durante 20 minutos a 121°C, después se lo dispensó en cajas Petri estériles y se esperó a que solidifiquen. Las bacterias y el consorcio comercial fueron inoculados en las placas, y después de 15 días de incubación se observaron los resultados. Las bacterias fueron incubadas a 16°C y el consorcio comercial a 37°C. Se utilizaron las incubadoras Precision (Thermo Scientific) para las bacterias de la Antártida y el consorcio comercial (Al Mohaini et al., 2022).

2.1.6 Criterio de selección para las pruebas de estabilidad

A partir de la determinación de la actividad lipolítica y la caracterización fenotípica de los microorganismos de la Antártida, se eligieron a los dos mejores. Estas bacterias, junto con el consorcio comercial constituido por cuatro especies de *Bacillus*, fueron analizadas y comparadas para determinar quién presenta una mejor capacidad de degradación de lípidos. Para esto, se evaluó cada dos días la densidad bacteriana de los dos microorganismos de la Antártida, así como del consorcio comercial, con la finalidad de obtener la curva de crecimiento de estos. Asimismo, cada dos días se realizaron titulaciones de acuerdo con lo descrito en 2.1.3.3 para conocer la actividad lipolítica de estos microorganismos, la cual fue determinada según lo previamente expuesto en 2.1.3.4. De acuerdo con lo descrito anteriormente, se seleccionó el día

de incubación de los microorganismos y del consorcio comercial para realizar las pruebas de estabilidad (Nimkande et al., 2023).

2.1.7 Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica

La actividad enzimática puede variar de acuerdo con las condiciones en las que se encuentra. Por este motivo, se evaluó la estabilidad de la actividad lipolítica obtenida de la lipasa producida por los dos mejores microorganismos seleccionados y por el consorcio comercial, frente a variaciones en el pH y diferente temperatura.

2.1.6.1 Estabilidad de la actividad lipolítica frente a variación del pH. Se evaluó la actividad lipolítica de los microorganismos de la Antártida y del consorcio comercial frente a un amplio rango de pH (2, 5, 7, 8, 10). Para esto, se tomaron alícuotas de la lipasa cruda en el punto en el que su actividad lipolítica era más alta (cinco alícuotas por cada microorganismo). Lo primero que se realizó fue medir el pH inicial de la lipasa cruda de cada uno de los microorganismos. Posteriormente, a cada alícuota se le cambió el pH a 2, 5, 7, 8 y 10, y se las incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se reestableció el pH inicial de las alícuotas. Finalmente, las alícuotas fueron tituladas para determinar si existe un cambio en la actividad lipolítica debido a variaciones en el pH (Nimkande et al., 2023).

2.1.6.2 Estabilidad de la actividad lipolítica frente a distintas temperaturas. Para esta evaluación se tomaron alícuotas de la lipasa cruda de los microorganismos y del consorcio comercial en el punto en el que su actividad lipolítica era la más alta (seis alícuotas por microorganismo y consorcio comercial), y se las incubaron durante 1h a diferentes temperaturas (-80°C, -20°C, 4°C, 20°C, 37°C, 50°C). Luego, las alícuotas fueron tituladas para determinar si la actividad lipolítica de la enzima lipasa de los microorganismos es estable frente a diferentes temperaturas (Nimkande et al., 2023).

2.1.6.3 Estabilidad de la actividad lipolítica frente a una temperatura de ebullición. Se tomaron 10 alícuotas de la lipasa cruda de cada microorganismo y del consorcio comercial. Se introdujeron 8 alícuotas en agua a 100°C durante 1h, cada 15 minutos se retiraron dos alícuotas de cada bacteria y del consorcio comercial del agua ebulliciendo. Después de eso, se tituló cada alícuota para determinar si la actividad lipolítica había variado debido al efecto de una alta temperatura (Nimkande et al., 2023).

Capítulo 3

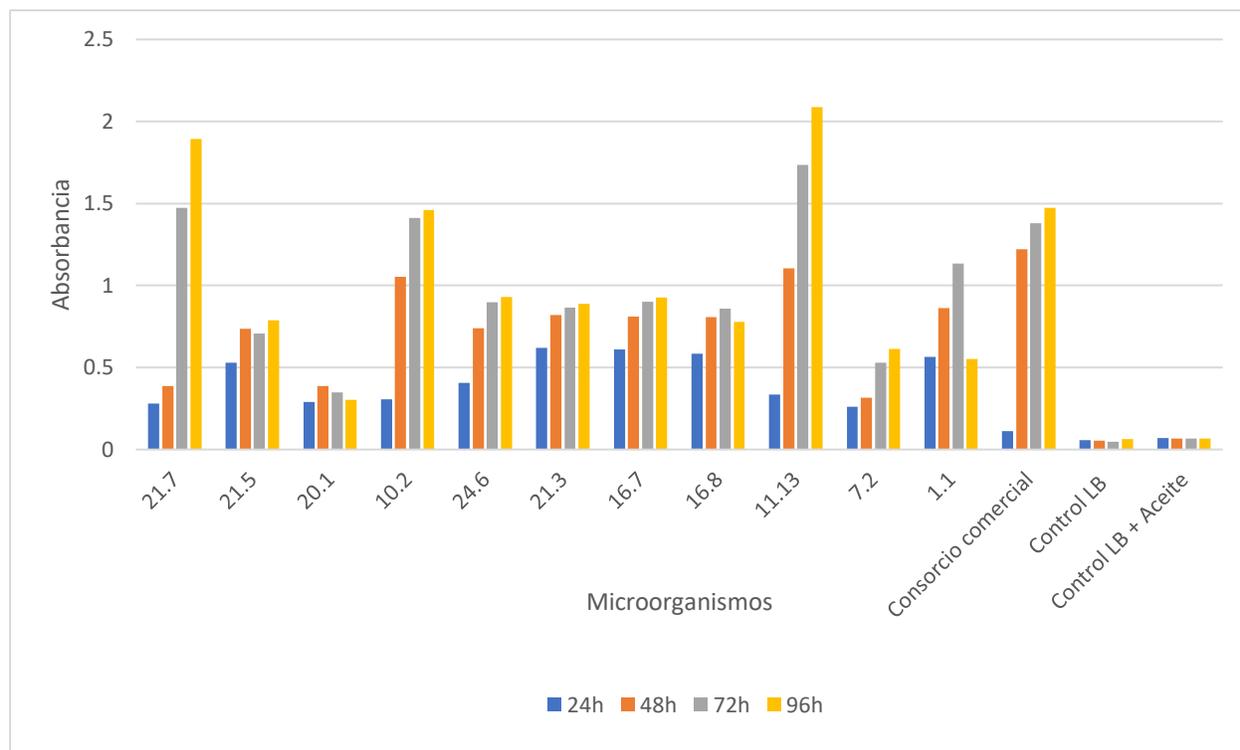
3.1 Resultados y análisis

3.1.1 Microorganismos seleccionados

Inicialmente, como criterio de selección, se midió la absorbancia de los microorganismos de la Antártida y del consorcio comercial a diferentes tiempos (24h, 48h, 72h y 96h) a 600nm, así como de sus controles. Tanto el control de medio LB como el de LB + aceite, no presentaron contaminación, lo cual se comprobó en la medición de absorbancia en cada uno de los diferentes tiempos. La absorbancia obtenida del control de LB + aceite fue restada a las mediciones de absorbancia de los microorganismos de la Antártida y del consorcio comercial, para así obtener la densidad bacteriana de cada uno de estos, lo cual es mostrado en la **Figura 3.1**.

Figura 3.1

Densidad óptica bacteriana de microorganismos de la Antártida y de un consorcio comercial (Espectrofotometría 600nm)



Nota. Datos obtenidos de la densidad óptica bacteriana a las 24, 48, 72 y 96 horas de incubación.

La selección de los microorganismos con mejor actividad lipolítica se realizó a las 96 horas, ya que, de acuerdo con la **Figura 3.1**, en este tiempo la densidad bacteriana del 72% de microorganismos es mayor, en contraste con menores cantidades tiempo.

Se reemplazó la variable Vs de la ecuación **(2.1)** con el promedio de la titulación de la lipasa cruda de cada microorganismo, para de esta forma obtener la actividad lipolítica de cada uno de los aislados y del consorcio comercial, lo cual es mostrado en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1

Actividad lipolítica de los microorganismos de la Antártida y del consorcio comercial a las 96h

	Microorganismos	(U/ml)
Bacterias	21.7	26.67
de la	21.5	66.67
Antártida	20.1	93.33
	10.2	86.67
	24.6	119.33
	21.3	33.33
	16.7	66.67
	16.8	26.67
	11.13	33.33
	7.2	46.67
	1.1	53.33
Consortio comercial		44.6

Nota. Datos obtenidos a partir de las titulaciones a las 96 horas de incubación.

El valor obtenido de la absorbancia de la lipasa cruda en el reactivo de Bradford fue utilizado en la ecuación de la curva de calibración de este reactivo **(3.1)**, para de esta manera obtener la cantidad de proteínas presentes en cada muestra de lipasa cruda. El resultado de la cuantificación de las proteínas de los microorganismos de la Antártida y del consorcio comercial a las 96h se indica en la **Tabla 3.2**.

$$y = 0.0008 x + 0.4178 \quad (3.1)$$

Tabla 3.2

Cuantificación de proteínas a las 96h

	Microorganismos	Absorbancia (595 nm)	Cantidad de proteínas
Bacterias de la Antártida	21.7	0.6175	249.63
	21.5	0.908	612.75
	20.1	0.726	385.25
	10.2	0.875	571.50
	24.6	0.538	150.25
	21.3	0.4745	70.88
	16.7	0.4975	99.63
	16.8	0.5245	133.38
	11.13	0.6555	297.13
	7.2	0.512	117.75
1.1	0.7615	429.63	
Consorcio comercial		0.4335	19.63

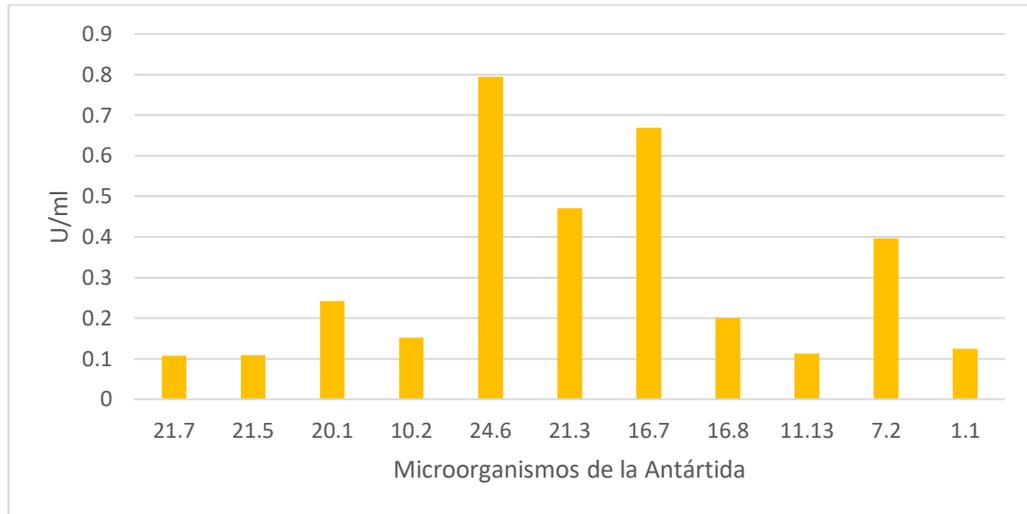
Nota. Cuantificación de proteínas presentes en la lipasa cruda.

Con el propósito de seleccionar los microorganismos de la Antártida con mejor capacidad degradadora de lípidos, se obtuvo la actividad enzimática específica de cada bacteria. De esta manera fue posible conocer cuál es la actividad enzimática producida por proteína, en cada uno de los microorganismos, como se puede observar en la

Figura 3.2.

Figura 3.2

Actividad enzimática específica



Nota. Actividad enzimática específica obtenida a partir de la actividad lipolítica y la cuantificación de proteínas.

A partir de la actividad enzimática específica, se determinó que las bacterias 24.6 y 16.7 poseen una mayor capacidad degradadora de lípidos, pues su actividad enzimática/proteínas es mayor en comparación con las demás bacterias.

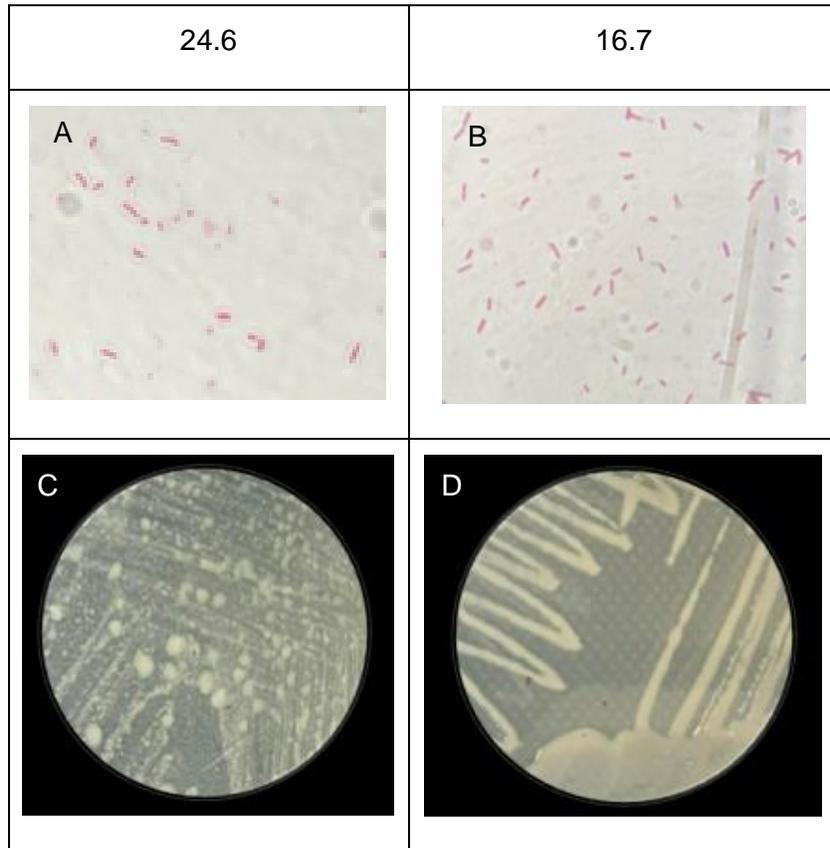
3.1.2 Fenotipo de los microorganismos de la Antártida seleccionados

Con el propósito de caracterizar la morfología microscópica de las bacterias seleccionados de la Antártida, se les realizó una tinción de Gram y se los visualizó en un microscopio a 100X. Como resultado, se obtuvo que ambas cepas son bacterias Gram negativas, ya que su coloración es rosada; además, su morfología corresponde a bacilos, como se observa en la **Figura 3.3**.

Asimismo, también se observó la morfología macroscópica de estos microorganismos, a partir de cual se determinó que la cepa 24.6 presenta colonias de color beige con apariencia viscosa, mientras que la cepa 16.7 presenta colonias de color amarillo claro de aspecto viscoso, como se muestra en la **Figura 3.3**.

Figura 3.3

Fenotipo de microorganismos de la Antártida seleccionados



Nota. Las fotos A y B pertenecen a la visualización microscópica con objetivo 100X de las tinciones de Gram realizadas; y las fotos C y D corresponden a la siembra de las bacterias de la Antártida en agar nutritivo.

Al consorcio comercial no se le realizó una identificación morfológica debido a que ya se conocía previamente que estaba conformado por especies del género *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, y *Bacillus pumilus*).

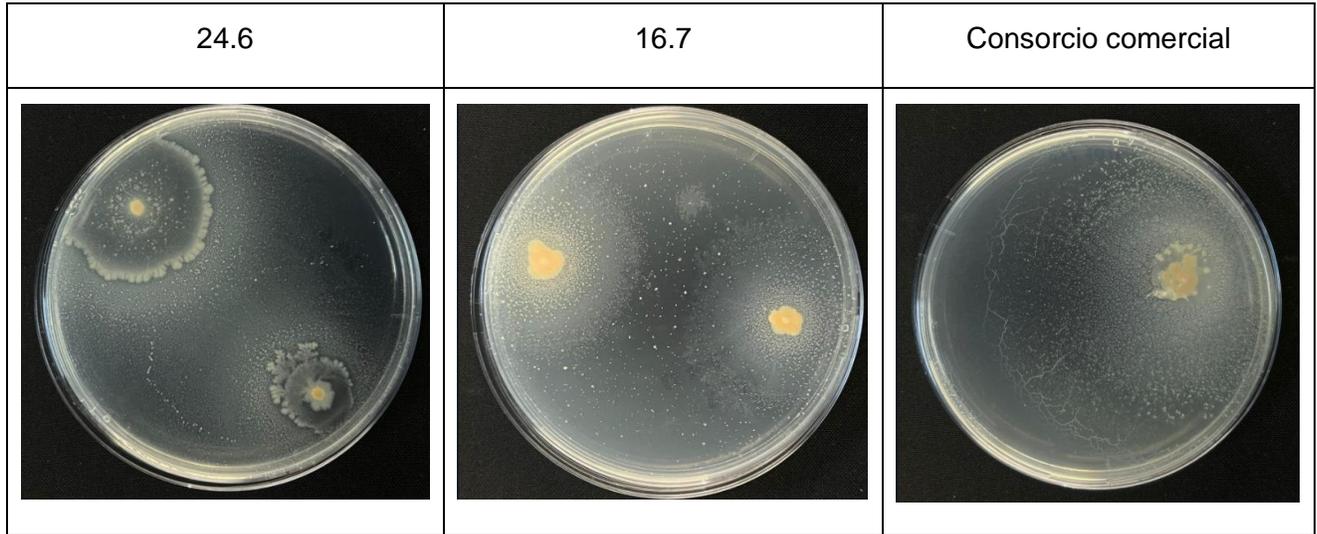
3.1.3 Evaluación cualitativa de la actividad lipolítica

Luego de inocular las cepas de la Antártida 24.6 y 16.7, y el consorcio comercial en Tween 20 durante 15 días, se pudo observar un precipitado lechoso blanco alrededor de las colonias.

Esto debido a la deposición de cristales por la acción de la lipasa que liberó ácidos grasos (Al Mohaini et al., 2022).

Figura 3.4

Actividad lipolítica evaluada cualitativamente en Tween 20



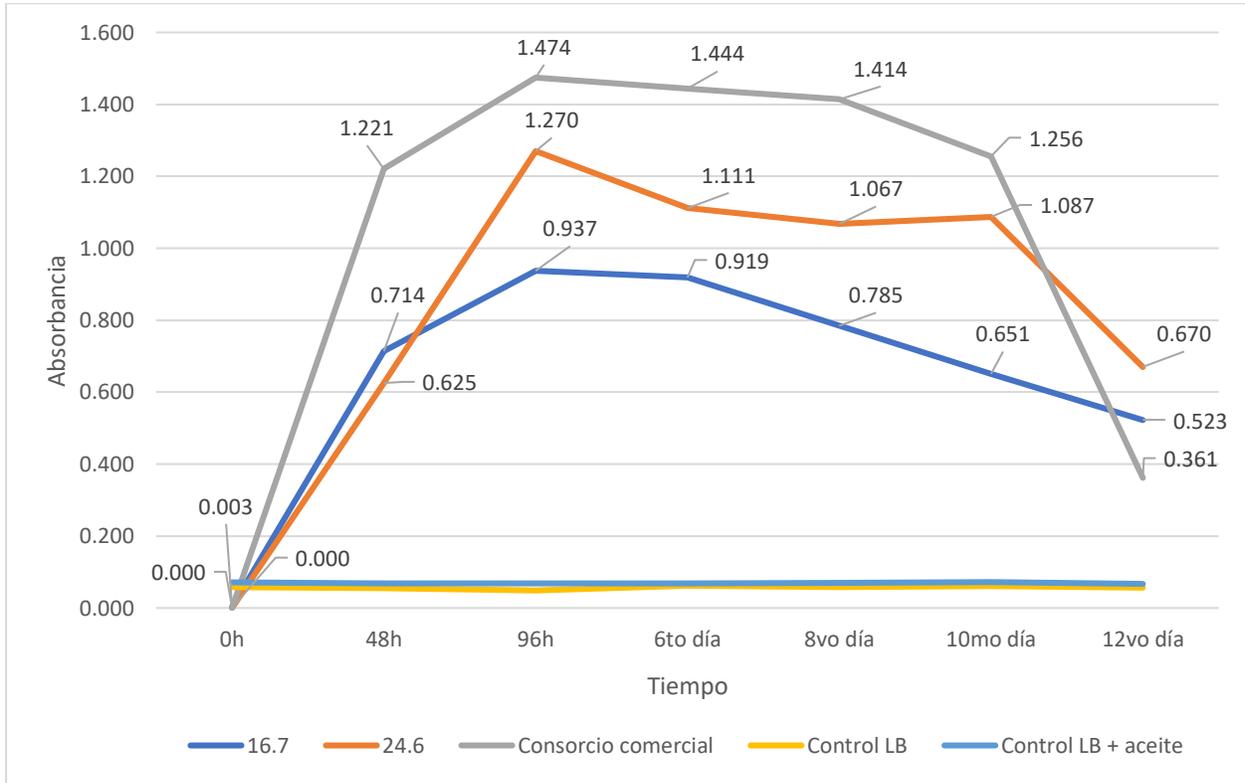
Nota. Resultados del ensayo cualitativo a los 15 días de incubación.

3.1.4 Criterio de selección para las pruebas de estabilidad

La selección de las horas de incubación adecuadas para realizar las pruebas de estabilidad, se determinó a través de la densidad bacteriana de las dos bacterias de la Antártida seleccionadas y del consorcio comercial. Ambos controles, el del medio LB y el de LB + aceite, no presentaron contaminación. La absorbancia obtenida del control de LB + aceite fue restada a las mediciones de absorbancia de los microorganismos y del consorcio comercial para así obtener la densidad bacteriana de cada uno de estos, la cual se puede observar en la **Figura 3.5**. Las curvas de densidad óptica indicaron una mayor absorbancia a las 96 horas de incubación, y a partir del sexto día la densidad óptica de los tres microorganismos comenzó a decrecer.

Figura 3.5

Densidad óptica bacteriana de las bacterias seleccionadas de la Antártida y de un consorcio comercial (Espectrofotometría 600nm)

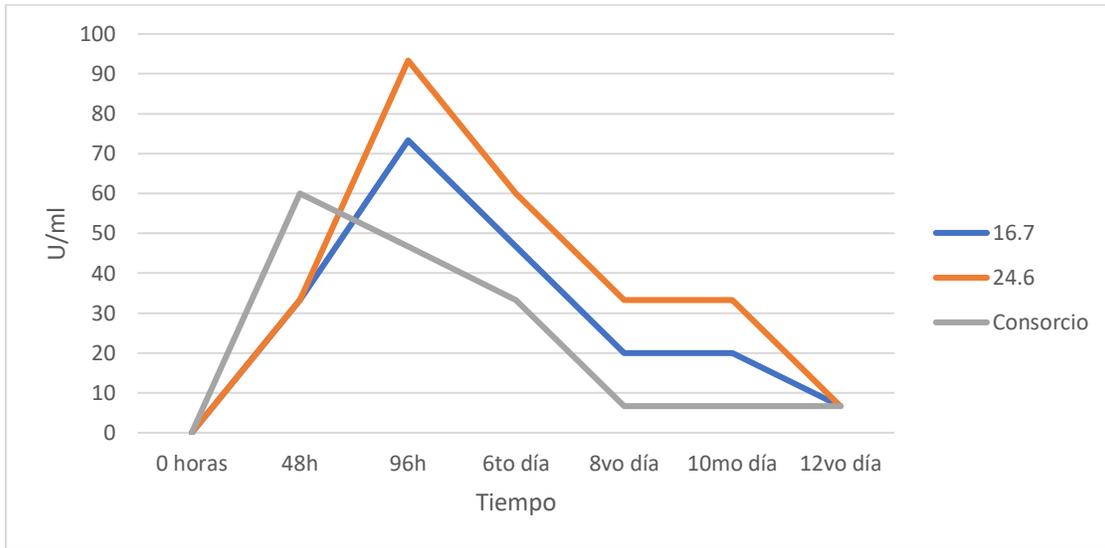


Nota. Curva de densidad óptica de las bacterias 24.6, 16.7 y del consorcio comercial.

También se determinó la curva de la actividad lipolítica de las dos cepas seleccionadas, 24.6 y 16.7, y del consorcio comercial. De acuerdo con la **Figura 3.6**, las bacterias de la Antártida tienen mayor actividad a las 96 horas y el consorcio comercial a las 48 horas. En los tres casos, la actividad lipolítica disminuye al sexto y octavo día. La actividad enzimática de las bacterias de la Antártida se mantiene constante hasta el décimo día, y disminuyen al doceavo día; por otro lado, la actividad lipolítica del consorcio se mantiene constante hasta el doceavo día. Por ello, para realizar los ensayos de estabilidad se consideraron las 96 horas de incubación de los microorganismos.

Figura 3.6

Curva de la actividad lipolítica de las bacterias seleccionadas de la Antártida y de un consorcio comercial



Nota. Actividad lipolítica obtenida cada dos días a partir de las titulaciones.

3.1.5 Influencia del pH en la actividad lipolítica

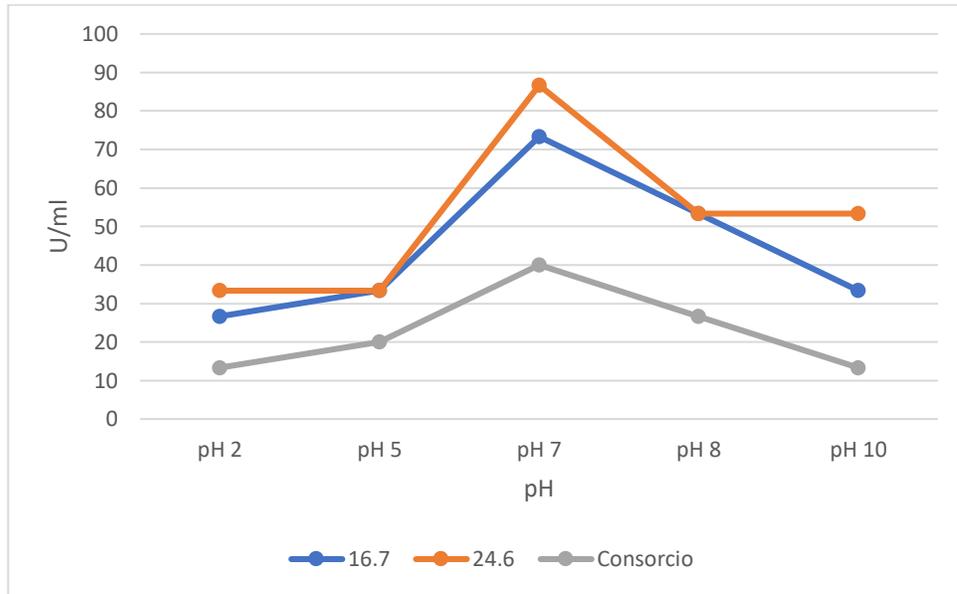
Alterar el pH del medio en el que se encuentra esta enzima, representa una variedad de efectos sobre la actividad enzimática de esta, ya que altera la estructura de la proteína e inhibe la catálisis de reacción. Por tal razón, se determinó la influencia que ejercen distintos valores de pH sobre la actividad lipolítica. Como se muestra en la **Figura 3.7**, tanto en las bacterias 16.7 y 24.6, así como en el consorcio comercial, existe un aumento progresivo de la actividad lipolítica desde pH 2 hasta pH 7, para luego disminuir en los pH 8 y 10. El pH 7 es el óptimo para la actividad lipolítica de las enzimas lipasas producidas por las cepas 16.7 y 24.6 de la Antártida, así como del consorcio comercial, lo cual evidencia el comportamiento neutro de las enzimas lipasa producidas por estos microorganismos. Esta coincidencia en el pH óptimo para la actividad enzimática podría sugerir una vía enzimática común entre todos estos microorganismos ante este pH. Esto también es expuesto en la **Figura 3.9**, ya que el porcentaje de estabilidad de la actividad lipolítica en este pH se acerca o es igual al 100%.

Al comparar los valores de la **Figura 3.8** del consorcio comercial con la de los demás microorganismos, es evidente que éste primero posee una actividad lipolítica específica más baja que las bacterias de la Antártida. Además, es posible notar que la bacteria 16.7 posee una actividad lipolítica específica más alta que la bacteria 24.6, excepto en pH 10. Es interesante destacar que, aunque la actividad lipolítica es mayor en la cepa 24.6, la actividad lipolítica específica es mayor en la cepa 16.7, esto quiere decir que en la cepa 16.7 hay una mayor actividad enzimática/proteína.

Como se muestra en la **Figura 3.9**, en valores de pH ácidos (pH 2 y 5), la estabilidad de la actividad lipolítica de las bacterias de la Antártida fue del 32-42%, en contraste con la del consorcio comercial que fue del 26-40%. Por otro lado, en valores de pH básicos (pH 8 y 10), la estabilidad de la actividad lipolítica de las bacterias de la Antártida fue del 41-67%, en comparación con la del consorcio comercial que fue del 26-53%. Esto sugiere que las bacterias antárticas presentan una mayor capacidad de respuesta en su actividad lipolítica ante diferentes valores de pH alcalinos en contraste con valores de pH ácidos. Es fundamental destacar que las enzimas lipasas producidas por las bacterias provenientes de la Antártida presentan una actividad enzimática consistentemente superior en distintos valores de pH en comparación con la actividad lipolítica del consorcio comercial, y que, la lipasa tanto de los microorganismos de la Antártida como los del consorcio comercial posee actividad enzimática en un rango de pH 2 a 10.

Figura 3.7

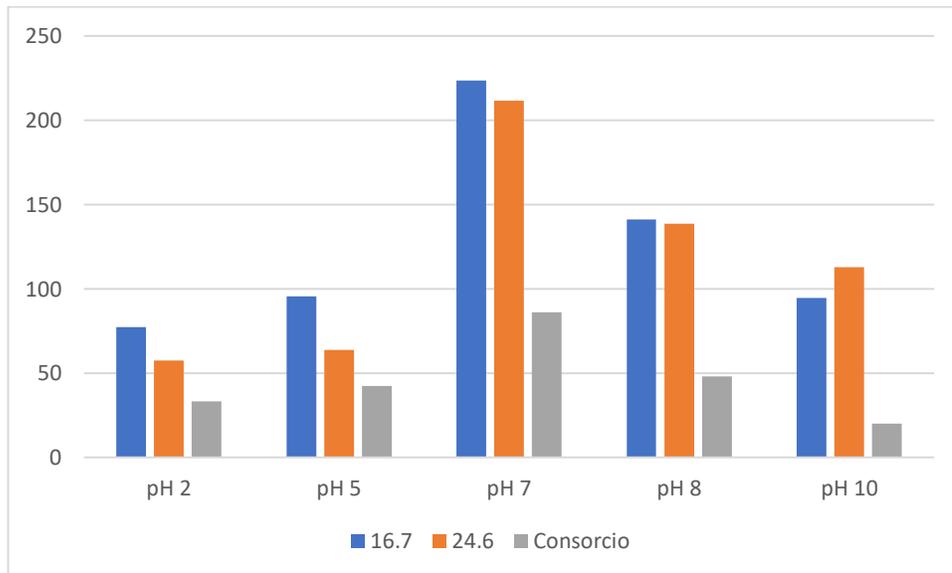
Actividad lipolítica de la lipasa cruda a diferentes valores de pH



Nota. Actividad lipolítica de la lipasa cruda obtenida a partir de las 96 horas de incubación de los microorganismos.

Figura 3.8

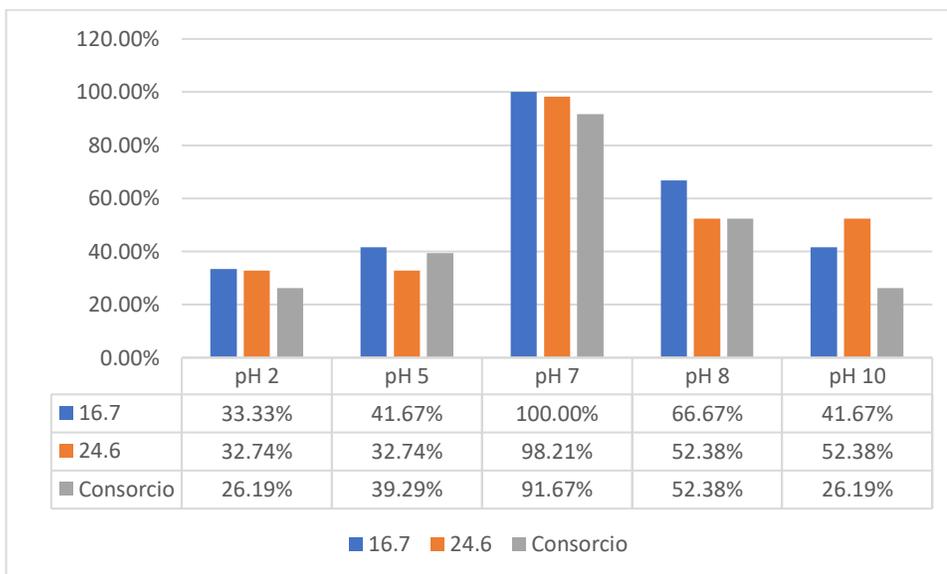
Actividad lipolítica específica a diferentes valores de pH



Nota. Actividad enzimática específica obtenida a partir de la actividad lipolítica y la cuantificación de proteínas.

Figura 3.9

Porcentaje de estabilidad a diferentes valores de pH



Nota. Porcentaje de estabilidad de la actividad lipolítica obtenido a partir del ensayo de estabilidad frente a una variación de pH.

3.1.6 Influencia de distintas temperaturas en la actividad lipolítica

La lipasa al ser una proteína es sensible a cambios en las condiciones de su medio, los cuales afectan la actividad enzimática de estas. Por ello, en este estudio la actividad lipasa fue puesta a prueba en un rango de temperatura de -80°C a 50°C , con una actividad enzimática máxima a los 20°C en el caso de la cepa 24.6 y del consorcio comercial, y -20°C y 20°C en el caso de la cepa 16.7, como se puede observar en la **Figura 3.10**.

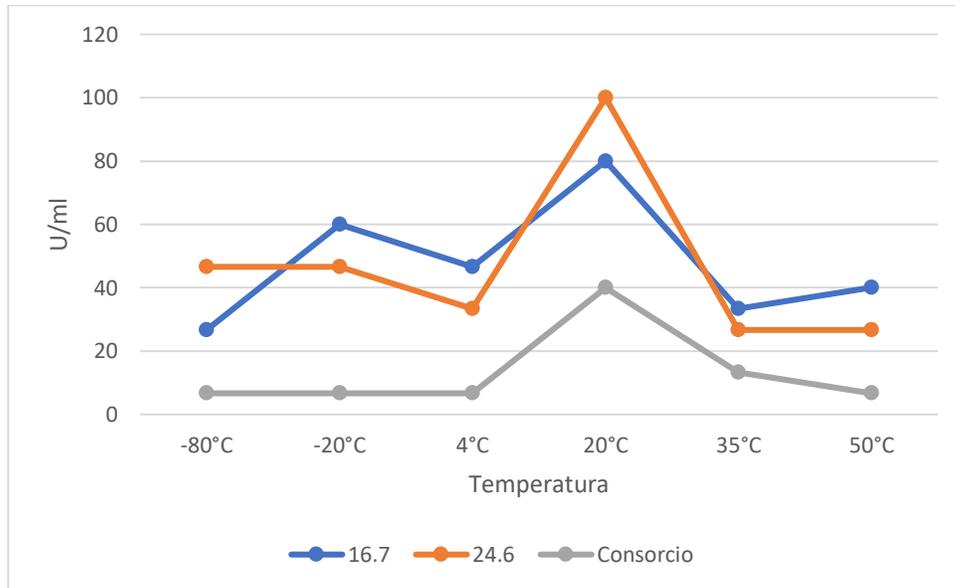
Según la **Figura 3.11**, la actividad lipolítica específica de las cepas (16.7 y 24.6) y del consorcio comercial fue mayor a una temperatura de 20°C . Además, se puede observar que el consorcio comercial posee una actividad enzimática específica menor que la de las bacterias de la Antártida en el rango de temperaturas descrito.

Asimismo, como se muestra en la **Figura 3.12**, la temperatura óptima para la actividad lipolítica es 20°C , ya que se acerca o es igual al 100% en el caso de las bacterias de la Antártida

(100% y 98.21%) y es del 78.57% en el caso del consorcio comercial. A pesar de que la actividad enzimática de las bacterias de la Antártida disminuye a temperaturas más altas y bajas, esta sigue siendo considerablemente mayor en comparación con la del consorcio comercial.

Figura 3.10

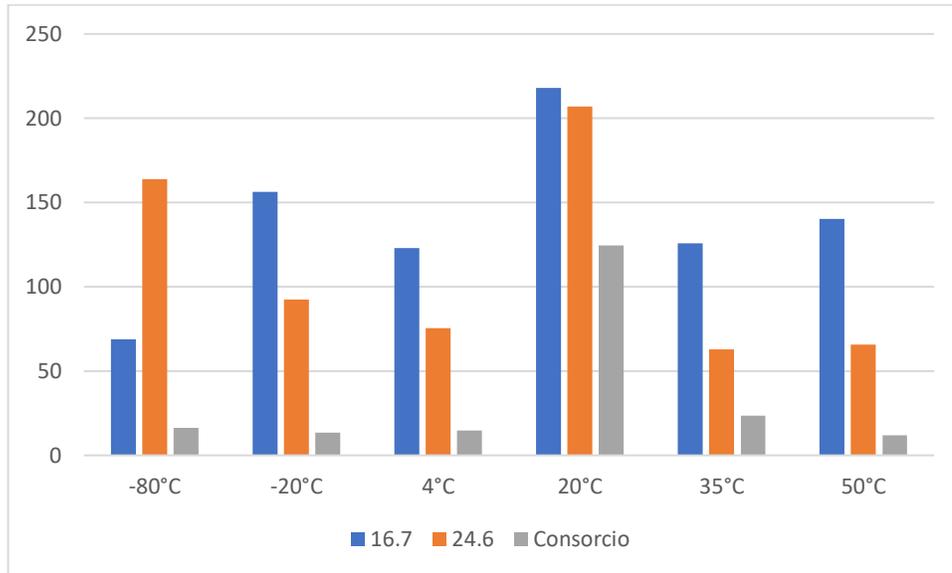
Estabilidad de la actividad lipolítica de la lipasa cruda a diferentes temperaturas



Nota. Actividad lipolítica de la lipasa cruda obtenida a partir de las 96 horas de incubación de los microorganismos

Figura 3.11

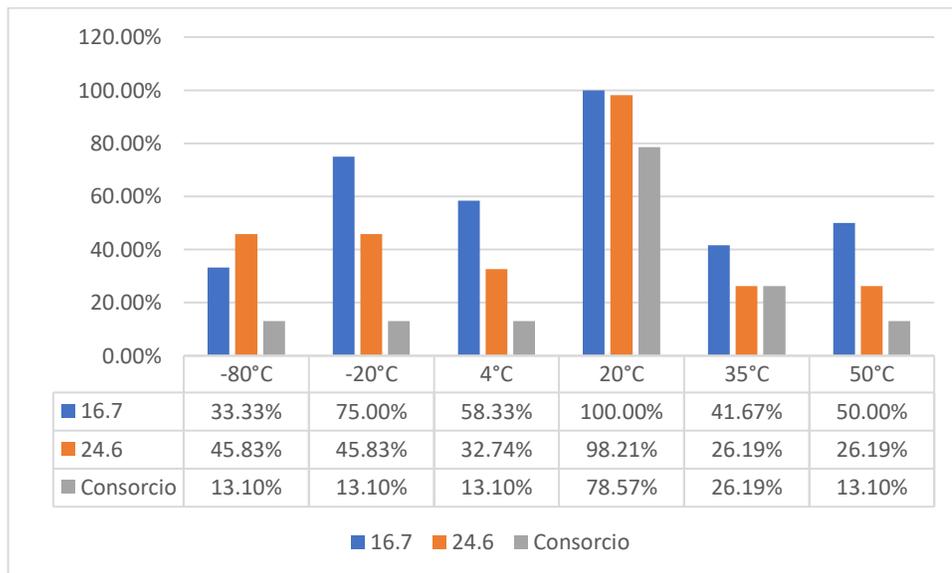
Actividad lipolítica específica a diferentes temperaturas



Nota. Actividad enzimática específica obtenida a partir de la actividad lipolítica y la cuantificación de proteínas.

Figura 3.12

Porcentaje de estabilidad de la actividad lipolítica a diferentes temperaturas



Nota. Porcentaje de estabilidad de la actividad lipolítica obtenido a partir del ensayo de estabilidad frente a diferentes temperaturas.

3.1.7 Influencia de una temperatura de ebullición en la actividad lipolítica

La actividad lipolítica fue determinada según la influencia de la temperatura de ebullición (100°C) en diferentes tiempos. De acuerdo con la **Figura 3.13**, la lipasa cruda de la cepa 16.7, 24.6, y del consorcio comercial tuvo una actividad enzimática máxima a los 0 minutos, es decir, antes de que la temperatura de ebullición ejerza un cambio sobre la estructura de las enzimas lipasas. A partir de los 15 minutos, la lipasa disminuye su actividad al estar expuesta por más tiempo a una temperatura alta.

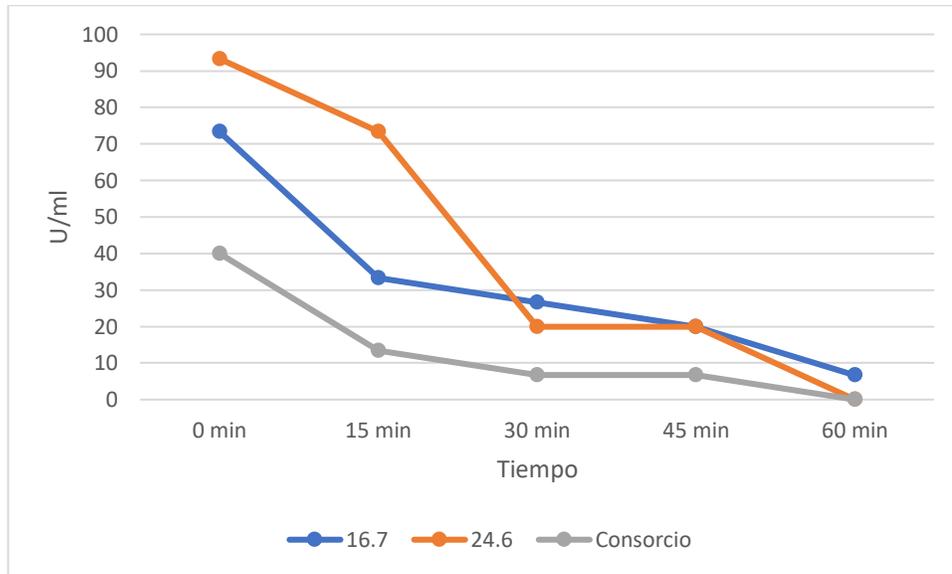
Al observar la **Figura 3.14**, la actividad lipolítica específica de la bacteria 16.7 y del consorcio comercial es más alta a los 0 minutos, mientras que la bacteria 24.6 tiene la actividad lipolítica específica más alta a los 15 minutos. Cabe destacar que, dado al efecto de la temperatura de ebullición sobre la enzima lipasa, la actividad enzimática específica de la cepa 16.7 y del consorcio comercial disminuye a partir de los 15 minutos. A pesar de que la actividad lipolítica de la cepa 24.6 disminuye desde los 15 minutos, su actividad enzimática específica tiene un aumento a los 15 minutos y va disminuyendo comenzando los 30 minutos.

La **Figura 3.15** muestra que la estabilidad de la actividad enzimática a los 0 minutos es del 100% en el caso de las bacterias de la Antártida y del 85.71% en el caso del consorcio comercial. La temperatura de ebullición (100°C) influye en la actividad lipolítica de los microorganismos y del consorcio comercial dado a que a partir de los 15 minutos el porcentaje de estabilidad se reduce hasta alcanzar un 0% a los 60 minutos, con excepción de la cepa 16.7 que llega a 9.09% en una hora. Esto debido a que, a elevadas temperaturas, las enzimas sufren de desnaturalización de sus estructuras proteicas, lo que produce un decrecimiento en la actividad lipolítica.

Con respecto a lo descrito anteriormente, se debe destacar que la actividad lipolítica de las bacterias de la Antártida es mayor que la del consorcio comercial en todos los tiempos que fue expuesta a la temperatura de ebullición.

Figura 3.13

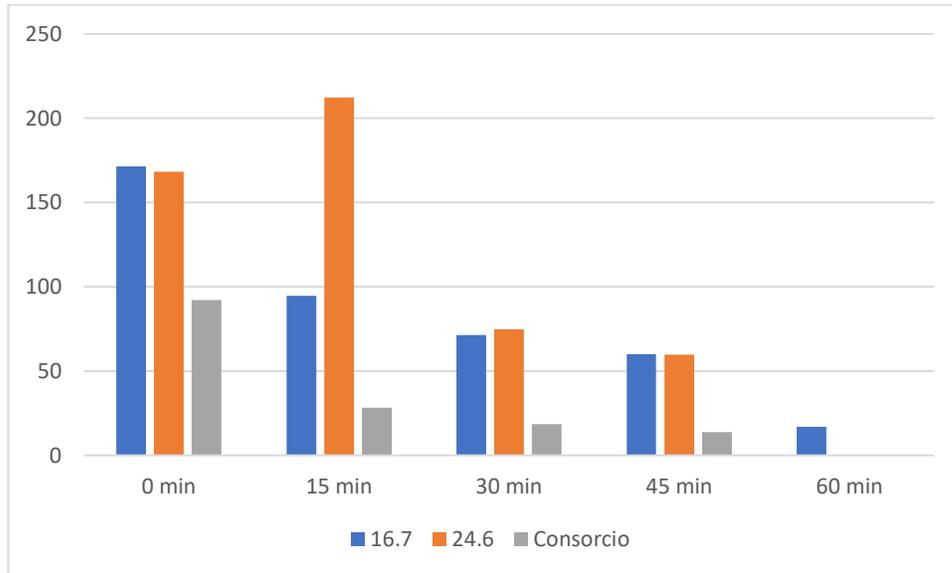
Actividad lipolítica de la lipasa cruda a temperatura de ebullición



Nota. Actividad lipolítica de la lipasa cruda obtenida a partir de las 96 horas de incubación de los microorganismos.

Figura 3.14

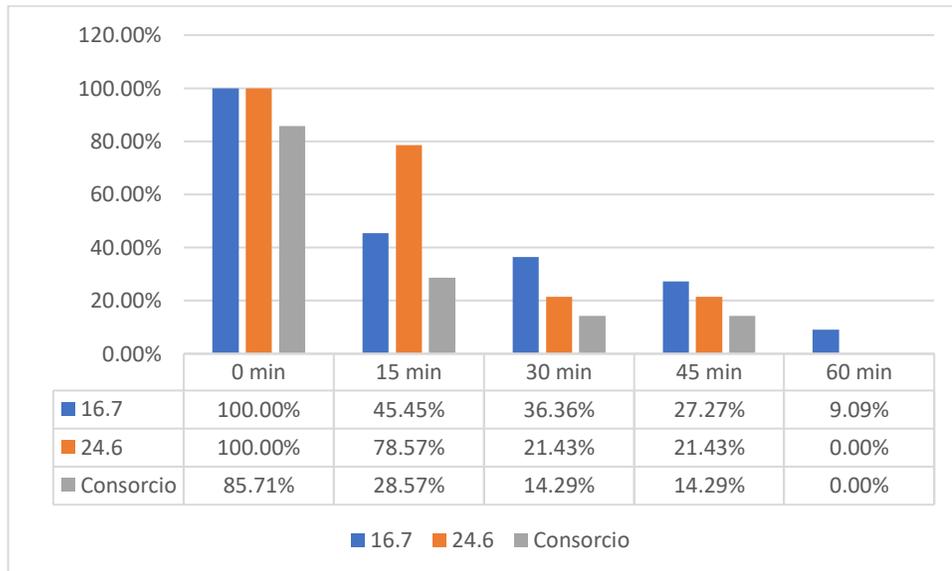
Actividad lipolítica específica a temperatura de ebullición



Nota. Actividad enzimática específica obtenida a partir de la actividad lipolítica y la cuantificación de proteínas.

Figura 3.15

Porcentaje de estabilidad a temperatura de ebullición



Nota. Porcentaje de estabilidad de la actividad lipolítica obtenido a partir del ensayo de estabilidad frente a una temperatura de ebullición.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

- Dos microorganismos aislados de la Antártida poseen las más altas actividades enzimáticas específicas, en contraste con un consorcio comercial.
- La actividad lipasa de estos microorganismos es a pH 7 y se determinó que la actividad enzimática es mayor a una temperatura de 20°C, en comparación con temperaturas más altas y bajas (-80°C, -20°C, 4°C, 20°C, 35°C y 50°C), pero posee un amplio rango de actividad a los diferentes pHs y temperaturas.
- Este estudio demostró la capacidad de degradación sobre lípidos que poseen las enzimas que provienen de bacterias antárticas. Por lo que su aplicación en trampas de grasa es factible, aunque es necesario hacer pruebas *in situ*.

4.1.2 Recomendaciones

- Secuenciar genéticamente a los microorganismos de la Antártida, ya que presentaron una actividad lipolítica superior a las especies de *Bacillus* conocidas y analizadas comparativamente en este estudio.
- Caracterizar las proteínas lipasas responsables de la actividad lipolítica obtenida, con el fin de determinar su estructura y conocer su mecanismo de acción en presencia de lípidos.
- Realizar un análisis para determinar cómo varía la actividad lipolítica en el tiempo, para así evaluar su estabilidad.
- Analizar cómo la actividad lipolítica es afectada al interactuar con otros microorganismos comúnmente presentes en trampas de grasa.
- Evaluar la posibilidad de utilizar las enzimas lipasas producidas por los microorganismos de la Antártida para la biorremediación de ecosistemas.

Referencias

- Alves, N. R., Pereira, M. M., Giordano, R. L. C., Tardioli, P. W., Lima, Á. S., Soares, C. M. F., & Souza, R. L. (2021). Design for preparation of more active cross-linked enzyme aggregates of *Burkholderia cepacia* lipase using palm fiber residue. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *44*(1), 57-66. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02419-0>
- Artuso, A. (2002). Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building. *World Development*, *30*, 1355-1368. [https://doi.org/10.1016/S0305-750X\(02\)00040-2](https://doi.org/10.1016/S0305-750X(02)00040-2)
- Bhumibhamon, O., Kopraserstak, A., & Funthong, S. (2002). *Biotreatment of High Fat and Oil Wastewater by Lipase Producing Microorganisms*.
- Bhumibhamon, O., & Phattayakorn, K. (2003). *Lipase-Producing Microorganisms for Use in Contaminated Fat and Oil Kitchen Wastewater Treatment*.
- Centeno Calderón, L. G. (2019). Efecto de un consorcio microbiano en la eficacia del tratamiento de aguas residuales, Trujillo, Perú. *Arnaldoa*, *26*(1). <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26123>
- Chinchilla Barrantes, N. P., Sagot Carvajal, P. M., Villalobos Villalobos, G. V., Chinchilla Barrantes, N. P., Sagot Carvajal, P. M., & Villalobos Villalobos, G. V. (2016). Educación nutricional y ambiental en el manejo de grasas residuales. *Revista Costarricense de Salud Pública*, *25*(2), 20-27.
- Correa, T., & Abreu, F. (2020). Antarctic microorganisms as sources of biotechnological products. En *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* (pp. 269-284). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00020-4>
- Espitia-Arias, A. C. (2010). *Determinación de la actividad lipolítica de microorganismos termófilos y/o acidófilos aislados de muestras de manantiales termales del Parque Nacional Natural Los Nevados*.

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8638/tesis596.pdf?sequence=1>

- Gurr, M. I., Harwood, J. L., Frayn, K. N., Murphy, D. J., & Michell, R. H. (2016). *Lipids: Biochemistry, Biotechnology and Health* (Vol. 6). John Wiley & Sons.
- He, X., So, M. J., & de los Reyes, F. L. (2016). Shifts in microbial communities in bioaugmented grease interceptors removing fat, oil, and grease (FOG). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 7025-7035. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7398-7>
- Husain, I. A. F., Alkhatib, M. F., Jammi, M. S., Mirghani, M. E. S., Zainudin, Z. B., & Hoda, A. (2014). Problems, Control, and Treatment of Fat, Oil, and Grease (FOG): A Review. *Journal of Oleo Science*, 63(8), 747-752. <https://doi.org/10.5650/jos.ess13182>
- Lauprasert, P., Chansirattana, J., & Paengjan, J. (2017). Effect of Selected Bacteria as Bioremediation on the Degradation of Fats Oils and Greases in Wastewater from Cafeteria Grease Traps. *European Journal of Sustainable Development*, 6(2), Article 2. <https://doi.org/10.14207/ejsd.2017.v6n2p181>
- Lee, L. P., Karbul, H. M., Citartan, M., Gopinath, S. C. B., Lakshmipriya, T., & Tang, T.-H. (2015). Lipase-Secreting *Bacillus* Species in an Oil-Contaminated Habitat: Promising Strains to Alleviate Oil Pollution. *BioMed Research International*, 2015, e820575. <https://doi.org/10.1155/2015/820575>
- Naciones Unidas. (2018). *La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: Una oportunidad para América Latina y el Caribe*.
- Nimkande, V. D., Sivanesan, S., & Bafana, A. (2023). Screening, identification, and characterization of lipase-producing halotolerant *Bacillus altitudinis* Ant19 from Antarctic soil. *Archives of Microbiology*, 205(4), 113. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03453-8>

- Parra, L. P., Espina, G., Devia, J., Salazar, O., Andrews, B., & Asenjo, J. A. (2015). Identification of lipase encoding genes from Antarctic seawater bacteria using degenerate primers: Expression of a cold-active lipase with high specific activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 68, 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.10.004>
- Reed, P. (2005). Bioprospecting. *The Technology Teacher*, 64(4). https://digitalcommons.odu.edu/stemps_fac_pubs/156
- Salwoom, L., Raja Abd Rahman, R. N. Z., Salleh, A. B., Mohd. Shariff, F., Convey, P., Pearce, D., & Mohamad Ali, M. S. (2019). Isolation, Characterisation, and Lipase Production of a Cold-Adapted Bacterial Strain *Pseudomonas* sp. LSK25 Isolated from Signy Island, Antarctica. *Molecules*, 24(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/molecules24040715>
- Sánchez, J. A. G. (2018). *Caracterización fisicoquímica y energética de los lodos presentes en las trampas de grasa provenientes de la industria alimentaria*. Universidad Central del Ecuador.
- Solis, O. L. (2020). *Tendencias en la Infraestructura de tratamiento de agua residual en Ecuador*. https://www.academia.edu/44100844/Tendencias_en_la_Infraestructura_de_tratamiento_de_agua_residual_en_Ecuador
- Sultana, N., Roddick, F., Gao, L., Guo, M., & Pramanik, B. K. (2022). Understanding the properties of fat, oil, and grease and their removal using grease interceptors. *Water Research*, 225, 119141. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119141>
- Tang, H. L., Xie, Y. F., & Chen, Y.-C. (2012). Use of Bio-Amp, a commercial bio-additive for the treatment of grease trap wastewater containing fat, oil, and grease. *Bioresource Technology*, 124, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.012>
- Tzirita, M., Papanikolaou, S., & Quilty, B. (2018). Degradation of Fat by a Bioaugmentation Product Comprising of *Bacillus* spp. Before and After the Addition of a *Pseudomonas* sp.

European Journal of Lipid Science and Technology, 120(2), 1700264.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201700264>

Tzirita, M., Papanikolaou, S., & Quilty, B. (2019). Enhanced fat degradation following the addition of a *Pseudomonas* species to a bioaugmentation product used in grease traps. *Journal of Environmental Sciences*, 77, 174-188. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.07.008>

Tzirita, M., Papanikolaou, S., & Quilty, B. (2021). A study of the suitability of three commercial bioaugmentation products for use in grease traps. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11(3), 907-924. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00549-4>

Windevoxhel, R., Sanchez, N., Bastardo, H., & Malaver, N. (2011). *Bioaumentación y sustancias húmicas en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo*. 18(1).