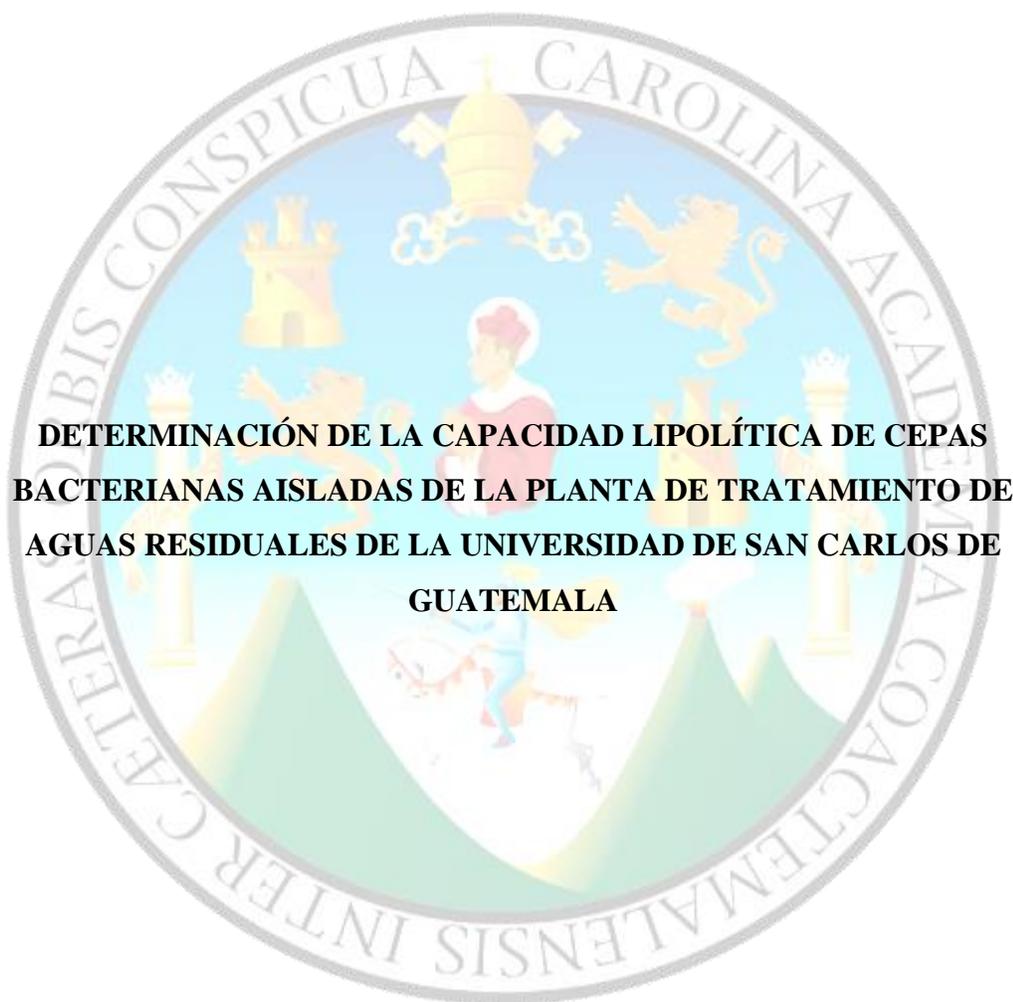


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD LIPOLÍTICA DE CEPAS
BACTERIANAS AISLADAS DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE
AGUAS RESIDUALES DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA**

Lesly Celina Suchini Moscoso
Shirley Carolina Carrera Monterroso

Químicas Biólogas

Guatemala, Noviembre de 2020

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD LIPOLÍTICA DE CEPAS
BACTERIANAS AISLADAS DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE
AGUAS RESIDUALES DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

Presentado por

Lesly Celina Suchini Moscoso
Shirley Carolina Carrera Monterroso

Para optar al título de
Químicas Biólogas

Guatemala, Noviembre de 2020

JUNTA DIRECTIVA

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Doctor Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal Primero
Doctor Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal Segundo
Licenciado Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal Tercero
Bachiller Giovani Rafael Funes Tovar	Vocal Cuarto
Bachiller Carol Merari Caceros Castañeda	Vocal Quinto
Licenciada Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria

ACTO QUE DEDICO

A DIOS: quien es mi vida, mi guía, mi fortaleza y quien me dio la sabiduría y las oportunidades; que todo esto no sería posible sin él.

A MIS PADRES: Edgar Neptaly Carrera Diaz y Georgina Monterroso de Carrera que se esforzaron para que esto sea posible, que siempre estuvieron conmigo, quienes son mi ejemplo a seguir, por siempre preocuparse por mí, haberme inculcado principios y valores, que siempre han estado para mí, por creer en mí y darme su amor y apoyo incondicional.

A MIS HERMANOS: Edgar, Astrid y Jaqueline Carrera que son mi ejemplo en todo lo que hacen, que siempre me han apoyado y siempre están a mi lado.

A TODA MI FAMILIA: En especial a mi abuelita Berta por siempre preocuparse y estar pendientes por mí, que de algún modo siempre me apoyaron para lograr mis sueños, por los buenos momentos que hemos compartido y sus palabras de ánimo que me ayudaron a seguir adelante.

Shirley Carolina Carrera Monterroso

A DIOS: Por ser mi guía en los momentos más importantes de mi vida y darme la sabiduría necesaria para alcanzar esta meta.

A MIS PADRES: César Suchini y Celina Moscoso, por todo su amor, sacrificios y esfuerzos que han hecho, por creer en mí y estar conmigo apoyándome incondicionalmente en todo momento y ser ejemplo de esfuerzo y dedicación. Los amo

A MIS HERMANAS: Maricely Suchini y Karolina Suchini por ser mis compañeras de vida, por sus consejos, cariño, paciencia, comprensión y motivación para seguir adelante. Las amo.

A MI SOBRINO: Leonel Muñoz por ser mi fuente de alegría y energía para seguir adelante.

A MI ABUELITO: Cesar Moscoso por estar siempre pendiente de mí, por sus sabios consejos y por todo su amor.

A MI ANGEL: Enma Suchini, mi ángel guardián, mi protectora incondicional, que toda la vida me apoyó, me dio su amor y me enseñó a ser fuerte, a seguir adelante a pesar de la adversidad. Siempre vives en mi corazón.

A TODA MI FAMILIA: por todas las muestras de cariño y apoyo.

A MIS AMIGOS: por su cariño, comprensión, consejos y apoyo incondicional a lo largo de la carrera.

Lesly Celina Suchini Moscoso

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarnos sabiduría, inteligencia y fortaleza durante todos estos años.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por ser la base de nuestra formación como profesionales.

A nuestro asesor de investigación, MSc. Sergio Lickes por todo el apoyo, conocimiento y tiempo que nos brindó durante todo el proceso de la investigación.

A nuestro asesor estadístico Dr. Jorge Luis de León por todo su apoyo y por el aporte de sus conocimientos para el desarrollo de este trabajo. Gracias.

A nuestro revisor, Lic. Ricardo Figueroa por la colaboración y transmisión de sus conocimientos durante la investigación.

Al Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR- por su apoyo durante todas las fases de este estudio.

A la Unidad de Análisis Instrumental (UAI) dependencia de la Escuela de Química por su asesoramiento técnico en la toma de muestras y medición de la cantidad de grasas y aceites en las muestras obtenidas.

A nuestros catedráticos gracias por transmitirnos sus conocimientos.

A todos aquellos que de una u otra forma colaboraron con nuestro trabajo e hicieron posible que este se llevara a cabo.

Índice

I.	Resumen	1
II.	Ámbito de investigación	3
III.	Antecedentes	5
	A.Lípidos	5
	1.Clasificación de los lípidos	5
	a. Triacilgliceroles	6
	b. Ácidos grasos	6
	B.Efluentes	6
	1. Efluentes líquidos de origen industrial	7
	a. Efluentes con alto contenido de grasas	7
	C.Bacterias lipolíticas	8
	D.Enzimas lipolíticas	8
	1.Estructura	9
	2.Mecanismo de acción	10
	3.Aplicaciones	10
	E.Interacciones interespecíficas negativas o antagónicas	12
	F.Métodos semi-cuantitativos para determinar la actividad lipolítica	12
	1.Agar tributirina	12
	2.Degradación de la lecitina	12
	3.Agar Rojo Neutro	13
	G.Estudios previos	13
IV.	Justificación	15
V.	Objetivos	17
VI.	Hipótesis	18

VII.	Materiales y métodos	19
	A.Universo de Trabajo.....	19
	1.Universo	19
	2.Muestra	19
	3.Criterios de inclusión	19
	4.Criterios de exclusión	19
	B.Recursos	19
	1.Recursos humanos	19
	a.Asesores	19
	b.Seminaristas.....	20
	2.Institucionales	20
	3.Materiales.....	20
	C.Enfoque y tipo de investigación.....	21
	D.Métodos	22
	1.Revitalización de las cepas	22
	2.Evaluación de la actividad lipolítica	22
	3.Evaluación de la actividad antagónica.....	22
	4.Determinación de la eficiencia de la degradación de grasas en agua residual..	23
	a.Toma de Muestra de agua residual	23
	b.Inoculación de los pares de cepas.....	24
	c.Medición de grasas y aceites.....	24
	E.Análisis estadístico	25
VIII.	Resultados	25
IX.	Discusión de resultados	29
X.	Conclusiones.....	32

XI.	Recomendaciones	33
XII.	Referencias bibliográficas	34
XIII.	Anexos	38

I. Resumen

Las aguas residuales con altos contenidos de grasas y aceites producidos durante los procesos de transformación industrial constituyen una amenaza para el medio ambiente y la salud humana. A menudo el tratamiento de dichas aguas requiere de técnicas convencionales como la flotación, métodos gravitacionales, tratamiento químico donde se utilizan productos como el ácido sulfúrico, el hierro y el sulfato de aluminio, sin embargo, estos métodos resultan costosos, de baja eficiencia de eliminación y difíciles de aplicar. El uso de trampas de grasas, generalmente se ve limitado debido a la acumulación de suciedad que generan, lo que causa problemas de olor y las condiciones corrosivas acortan drásticamente la vida útil de la trampa. Debido a la complejidad de los métodos actuales para el tratamiento de aguas residuales, en la actualidad la utilización de microorganismos lipolíticos para la bioconversión de las grasas y aceites en sustancias más inocuas y asimilables ha llamado la atención, ya que reduce costos y sus enzimas son biodegradables. En Guatemala, a pesar de ser un país con una gran diversidad microbiana, no se cuenta con ninguna investigación que demuestre la capacidad lipolítica de bacterias en el tratamiento de aguas residuales.

Por lo anterior el objetivo de este estudio fue determinar la eficiencia de degradación de grasas y aceites por parejas de cepas bacterianas aisladas de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala (PTAR USAC), en muestras de agua residual proveniente de una fábrica de embutidos ubicada en el Municipio de Fraijanes departamento de Guatemala.

Para ello se realizó un estudio experimental en donde se evaluó la capacidad lipolítica de 35 cepas aisladas de agua residual de la PTAR USAC en una muestra de agua residual de una fábrica de embutidos. Las 35 cepas fueron sembradas en agar Tributirina (1%) suplementado con Tween 80 (1%) con el fin de evidenciar a través de halos de hidrolisis la capacidad lipolítica de las cepas bacterianas, de estas el 75% (26) de las cepas presentó actividad lipolítica pero solo el 15% (5) de las cepas presentó halos de lipólisis mayores o iguales a 10 mm de diámetro correspondientes a los géneros *Pasteurella* sp., *Pseudomonas alcaligenes*, *Burkholderia arboris*,

Pseudomonas fluorescens y *Bacillus coagulans*. A estas últimas también se les evaluó la relación de antagonismo con el fin de poder probarlas en parejas, *Pseudomonas fluorescens* presentó efectos antagónicos con las cepas de *Pasteurella* sp. y *Pseudomonas alcaligenes*.

Por último los pares de cepas que no presentaron efectos antagónicos entre ellos se pusieron a prueba en la capacidad degradadora de grasas y aceites en una muestra de agua residual proveniente de una fábrica de embutidos; a las muestras de agua residual se les inoculó los pares de cepas por 15 días y al final se le midió la concentración de grasas y aceites; el par *Pseudomonas alcaligenes/Burkholderia arboris* es el que redujo en mayor cantidad la concentración de grasas y aceites; este redujo a una concentración de 23.6 ± 8.16 mg/L, el cual representa una eficiencia del 91% en la remoción de grasas y aceites presentes en la muestra de agua residual.

II. **Ámbito de investigación**

El agua es un compuesto indispensable para el desarrollo de la vida y de las actividades humanas. Las industrias usan agua potable para la elaboración de sus productos y es imprescindible que tenga una buena calidad para ser usada en los mismos. Sin embargo, además de su utilización en producción, algunas industrias generan desechos orgánicos e inorgánicos. Estas aguas residuales ocasionan un impacto ambiental negativo a causa de la alta carga de contaminantes que contienen, entre ellos, las grasas y aceites. Estas grasas y aceites generan en su descomposición, productos altamente tóxicos debido al proceso de peroxidación lipídica, los cuales causan daño celular en los animales. Asimismo, la descomposición de dichos residuos produce olores desagradables, componentes atrayentes de plagas e inclusive, podría afectar la salud de las comunidades cercanas; lo que constituye un problema de salud pública (González et al., 2012).

Para el tratamiento de residuos grasos industriales, se usan técnicas convencionales como la flotación, métodos gravitacionales, flotación por aire disuelto (DAF), tratamiento químico donde se utilizan productos como el ácido sulfúrico, el hierro y el sulfato de aluminio, para reducir la cantidad de aceite en el agua, sin embargo, no se han adoptado ampliamente debido a su alto costo, su baja eficiencia de eliminación y a daños por contaminación en las descargas de aguas residuales. Por otro lado, el uso de trampas de grasas, generalmente se ve limitado debido a la acumulación de suciedad que generan y para optimizar su funcionalidad, sus dimensiones son pequeñas, ya que las trampas demasiado grandes pueden llegar a ser estancadas, lo que causa problemas del olor y las condiciones corrosivas acortan drásticamente la vida útil de la trampa (Abass, Ahmad, Suleyman, Mohamed, & Zahangir, 2011).

Es por ello que en la actualidad se han buscado nuevas alternativas biotecnológicas para el tratamiento de este tipo de residuos y al mismo tiempo minimizar o detener los efectos negativos. Una de las alternativas es la utilización de microorganismos lipolíticos capaces de bioconvertir las grasas y aceites, a través de las lipasas excretadas por dichos microorganismos, que provocan la hidrólisis del enlace éster del triglicérido, seguido por el consumo del glicerol y beta oxidación de los ácidos grasos, convirtiéndolos de esta manera en sustancias más inocuas y asimilables,

logrando así disminuir la contaminación ambiental que estos ocasionan. Además, el uso de dichos microorganismos reduce costos y sus enzimas son biodegradables (Vidales, Leos, & Campos, 2010), es por ello que en este estudio se determinó la capacidad lipolítica de las bacterias aisladas de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se evaluó la relación de antagonismo en las cepas que presentaron mayor actividad lipolítica y por último se evidenció su actividad en el tratamiento de aguas residuales.

III. Antecedentes

A. Lípidos

Los lípidos son un conjunto de biomoléculas cuya característica distintiva es la insolubilidad en agua y la solubilidad en solventes orgánicos (benceno, cloroformo, hexano, entre otros). Estos también son llamados grasas en su estado sólido y aceites cuando se encuentran líquidos a temperatura ambiente; sin embargo, con frecuencia, se usa el término grasas para referirse en general a los lípidos (Cabezas, Hernández, & Vargas, 2015).

Las grasas son mezclas de triglicéridos, formados por 3 moléculas de ácidos grasos y una de glicerol (Anexo 1). Las diferencias entre ellas dependen fundamentalmente de la composición en los ácidos grasos, del número de átomos de carbono y de dobles enlaces. Las grasas pueden clasificarse en visibles, como la mantequilla, el aceite de oliva o la grasa visible de la carne, invisibles como las de la leche, los frutos secos o los pescados (Vidales et al., 2010).

1. Clasificación de los lípidos

Los lípidos se pueden clasificar en hidrolizables, es decir que por acción del agua se descomponen en moléculas más sencillas, y no hidrolizables. Entre los hidrolizables se encuentran los siguientes grupos: las grasas o triacilgliceroles (1 glicerol y 3 ácidos grasos) que pertenecen a los ésteres simples junto con las ceras (1 alcohol graso y ácidos grasos) y los ésteres de esterol (1 esterol y ácidos grasos). Entre los ésteres con un grupo fosfato característico se encuentran los fosfolípidos, entre ellos los fosfátidos (1 glicerol, 2 ácidos grasos y 1 fosfato) que incluye a los fosfátidos (1 glicerol, 2 ácidos grasos, 1 fosfato y 1 aminoalcohol) y los esfingolípidos en donde el glicerol se encuentra sustituido por la esfingosina, entre estos son importantes los glucolípidos (cerebrósidos y gangliósidos) que tienen un contenido característico de azúcar. Por otro lado, los no hidrolizables se encuentran comprendidos entre: los hidrocarburos (alcanos y carotenoides), lípidos alcoholes (alcanoles de cadena larga, esteroides cíclicos como el colesterol y esteroides) y los ácidos grasos que son los más importantes entre los lípidos (Koolman & Rohm, 2004).

a. Triacilgliceroles

Los acilgliceroles son compuestos en los que uno o más de los grupos hidroxilo se encuentran esterificados, en los triglicéridos los tres grupos hidroxilo se encuentran esterificados con ácidos grasos. Son los más abundantes en la naturaleza y dependiendo de su estado físico a temperatura ambiente se pueden clasificar como grasas neutras (sólidos) o aceites neutros (líquidos). Su estado físico depende de su composición de ácidos grasos, así como de la temperatura. Son hidrofóbicos y no forman micelas estables, estos se pueden hidrolizar a glicerol y ácidos grasos mediante hidrólisis alcalina fuerte o adición de enzimas (lipasas) (Devlin, 2004).

b. Ácidos grasos

Tienen una estructura de cadena lineal anfipática con un extremo polar (carboxilo) y una cadena apolar que finaliza con un grupo metilo. Existen ácidos grasos con un número par de átomos de carbono y en función de ese número se clasifican como ácidos grasos de cadena corta (≤ 10 átomos de carbono), de cadena media (12 o 14) y de cadena larga (≥ 16). Según la presencia de enlaces en su cadena se encuentran los ácidos grasos saturados que sólo poseen enlaces sencillos entre átomos de carbono adyacentes, lo que les confiere una gran estabilidad y la característica de ser sólidos a temperatura ambiente, estos predominan en los alimentos de origen animal, aunque también se encuentran en grandes cantidades en algunos alimentos de origen vegetal como los aceites de coco, palma y palmiste, también llamados aceites tropicales. También se encuentran los ácidos grasos monoinsaturados que poseen un solo doble enlace, y los ácidos grasos poliinsaturados, que poseen dos o más dobles enlaces que pueden reaccionar con el oxígeno del aire aumentando la posibilidad de enranciamiento de la grasa, estas se encuentran en los pescados y algunos alimentos de origen vegetal (Argueso et al., 2011).

B. Efluentes

El término efluente se emplea para nombrar a las aguas servidas con desechos sólidos, líquidos o gaseosos que son emitidos por viviendas y/o industrias generalmente a los sistemas de

desagües y terminan en los ríos y mares (Nemerow & Dasgupta, 1998). La Agencia de Protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA) define efluente como aguas residuales tratados o no, que fluyen fuera de una planta de tratamiento, drenaje o desagüe industrial. Se pueden clasificar de diferentes maneras. Por su naturaleza y estado se encuentran los efluentes: sólidos, líquidos, gases, humos, olores y ruidos. Por su origen: efluentes domésticos e industriales (Huané & Rivera, 2014).

1. Efluentes líquidos de origen industrial

En la actualidad los conglomerados humanos y particularmente los centros industriales absorben enormes volúmenes de agua que luego de su uso se transforman en aguas servidas o residuales. Las aguas residuales industriales son todas aquellas que resultan de los procesos llevados a cabo en fábricas y establecimientos industriales y que pueden contener contaminantes como: aceites, detergentes, antibióticos, ácidos, grasas u otros productos y subproductos de origen mineral, químico, vegetal o animal. Su composición es muy variable, dependiendo de las diferentes actividades industriales (Chumbita, 2017)

a. Efluentes con alto contenido de grasas

Son todas las emisiones que en su composición tienen una alta carga de aceites y/o grasas (lípidos). Su origen puede ser las aguas residuales domésticas, debido al uso de manteca, grasas y aceites vegetales en cocinas, los efluentes provenientes del comercio y expendios de comida rápida (frituras), industria de aceite (palma y pescado), productos lácteos (mantequilla, margarina, helados, yogurt, queso) y de los mataderos (Mora & Valencia, 2006).

Las grasas y aceites son de los compuestos orgánicos más estables y no son fácilmente biodegradables; Además, los ácidos minerales reaccionan con ellas dando como resultado la formación de ácidos grasos y glicerina. Los residuos grasos generados en el sector alimentario y

descargados al medio ambiente ocasionan impacto ambiental negativo debido a la alta carga orgánica e inorgánica que estos contienen. Cuando se descargan efluentes en los cuerpos de agua, los aceites y grasas presentes flotan, forman una película sobre el agua que causa daño a la microvida; así también cuando se arrojan grasas y aceites de forma desproporcionada a las redes de alcantarillado estos suelen causar atoro y daño a las tuberías (Huané & Rivera, 2014).

C. Bacterias lipolíticas

Las bacterias lipolíticas pertenecen a un grupo de bacterias heterogéneas que producen lipasas, estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar grasas y aceites. Es común que algunas bacterias aeróbicas, anaeróbicas y proteolíticas cumplan con características lipolíticas. Entre ellas se encuentran: *Bacillus*, *Clostridium*, *Erwinia* y *Pseudomonas* (Aceves & Castañeda, 2012).

Las bacterias lipolíticas para su desarrollo necesitan pH de 6 a 7, temperatura de 30 °C a 40 °C y como principal nutriente a las grasas para crecer y poder realizar adecuadamente sus funciones (Pazmiño, 2016).

D. Enzimas lipolíticas

Las enzimas lipolíticas son un grupo de enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en animales, en plantas como en microorganismos. Independientemente de su naturaleza, todas ellas tienen una actividad común, ya que catalizan la hidrólisis de los enlaces ésteres formados entre un ácido y un alcohol (Pedroza, Romero, & Orduz, 2017).

Se dividen en dos grandes grupos, lipasas y estererasas o carboxilesterasas. Las lipasas son específicas para acilgliceroles con ácidos grasos de cadena larga (>10 átomos de carbono), su sustrato de referencia es la trioleína; mientras que las estererasas actúan específicamente sobre acilgliceroles de cadena corta (<10 átomos de carbono), y otros ésteres simples, su sustrato

estándar es la tributirina, asimismo, las lipasas muestran preferencia por sustratos altamente hidrofóbicos, insolubles y agregados, presentan sitios de unión largos para acomodar al ácido graso a escindir y muestran un mayor número de aminoácidos no polares localizados en las zonas expuestas al solvente y en la región del centro activo, en comparación con las estererasas que actúan sobre sustratos más solubles, presentan un grado de hidrofobicidad más variable, un rango de sustrato más amplio, una mayor regioselectividad y estereoespecificidad (Navarro & Periago, 2012).

Las enzimas lipolíticas bacterianas han recibido un gran protagonismo debido a las ventajas que presentan: actúan en condiciones moderadas, simplicidad en el desarrollo de enzimas recombinantes, mantienen su estabilidad en solventes orgánicos y condiciones extremas de pH y temperatura, tienen alta especificidad y estereoselectividad, no necesitan cofactores, generan baja producción de residuos y altos rendimientos en su recuperación y reutilización, del mismo modo pueden obtenerse en procesos fermentativos cortos por la rápida división celular de los organismos productores y versatilidad del metabolismo microbiano en los medios de cultivo empleados (Cepeda & Valencia, 2007).

1. Estructura

Se ha encontrado que la mayoría de las lipasas comparten una estructura común, un plegamiento de polipéptidos compuesto por 8 láminas β , conectadas por 6 α -hélices. Una importante cualidad de las lipasas es que la triada catalítica formada por una serina nucleofílica, un ácido aspártico o un ácido glutámico y una histidina (Ser-His-Asp/Glu), está cubierta completamente por una tapa o “lid” que debe estar completamente abierta para acceder al sustrato, esta triada catalítica está embebida en una región consenso Gly-X-Ser-X-Gly, cuya función es estabilizar y orientar la serina nucleofílica. Las lipasas pueden existir en dos formas. En la forma cerrada o inactiva, donde el centro activo de la lipasa está escondido por una cadena polipeptídica que forma la tapa llamada “lid” y la forma abierta o activa, donde la cadena polipeptídica se desplaza y el centro activo se expone al medio de reacción (Rivera & García, 2007).

2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción es el mismo en lipasas que en esterasas, está basado en un sistema de intercambio de cargas y consta de 4 pasos (Anexo 2): primero, ocurre la unión al sustrato, posteriormente se produce el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de la serina catalítica sobre enlace éster del sustrato, esto gracias a que la serina es capaz de atacar al sustrato a través de la protonación de la histidina, y está a su vez se estabiliza gracias al puente de hidrógeno que forma con el ácido glutámico. La actuación de estos dos aminoácidos, histidina y glutámico se conoce con el nombre de sistema de relevos de cargas, porque gracias a las interacciones químicas que se producen entre ambos se lleva a cabo la activación de la serina. Este ataque nucleofílico inicial forma un tetraedro intermedio que es estabilizado por la presencia de dos glicinas cercanas al centro activo, que forma el centro oxianiónico. Este tetraedro es rápidamente descompuesto, con la ayuda de la histidina protonada, lo que provoca la liberación del alcohol del enlace éster y la formación del complejo acil-enzima. En presencia de agua, el complejo acil-enzima es atacado por una molécula de agua, con la ayuda de la histidina se forma un segundo tetraedro intermedio. Inmediatamente después se produce la liberación del ácido graso y como consecuencia de ello la regeneración del centro activo (Navarro & Periago, 2012).

3. Aplicaciones

Las enzimas lipolíticas han cobrado gran atención por su potencial aplicación en biotecnología. Muchas son las aplicaciones que se han encontrado para las lipasas, en la industria del aceite, la producción de farmacéuticos, agroquímicos y componentes aromáticos. Las lipasas son usadas en dos distintos ámbitos, son usadas en la catálisis para la manufactura de otros productos (como ingredientes alimentarios) y por sus aplicaciones (producción de químicos) (Rivera & García, 2007).

Dentro de la industria alimentaria, las lipasas, como su nombre lo indica básicamente hidrolizan lípidos produciendo ácidos grasos y glicerol, participan en la acidólisis (reemplazamiento de un ácido graso esterificado por un ácido graso libre), como también en la

transesterificación, que consiste en intercambiar el grupo alcoxi (RO-) de un éster por otro alcohol, este tipo de proceso es llevado a cabo para la producción de biodiesel a partir de aceite vegetal o animal. Las lipasas han pasado a ser una parte integral en la actual industria alimentaria, ya que se ha potenciado el uso de enzimas para mejorar procesos químicos tradicionales en la manufactura alimentaria. Se han utilizado para la producción de determinados sabores en quesos y otros alimentos por la producción de ácidos grasos volátiles. Dependiendo de la especificidad de las lipasas empleadas pueden liberarse ácidos grasos de cadena corta (C4-C6), que aportan un sabor fuerte y penetrante, o bien pueden liberarse ácidos grasos de cadena larga (>C12), de aspecto más jabonoso, que son metabolizados por los microorganismos presentes en el queso para producir otros productos aromáticos, como β -cetoácidos. Algunas grasas presentan más valor que otras por su estructura. Las grasas con menos valor pueden ser convertidas a grasas más útiles mediante métodos químicos, sin embargo, los productos generados son inespecíficos, esto es producido por una catálisis aleatoria, es decir que cualquiera de las tres posiciones de una grasa neutra puede ser hidrolizada. Las lipasas pueden catalizar la transesterificación de aceites con bajo valor, para la producción de productos con alto valor comercial, como la mantequilla de cocoa (Rivera & García, 2007).

Recientemente las enzimas lipolíticas son una alternativa promisoría para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con altos contenidos de lípidos. El agua con grasas producidas durante los procesos de transformación o refinación de lácteos y aceites tienen baja biodegradabilidad y afectan el medio ambiente, la fauna y flora cuando son vertidas a cuerpos de agua y suelos sin ningún tratamiento previo; ante esta problemática y en comparación con los procesos químicos convencionales, la prehidrólisis de grasas o aceites por lipasas de origen microbiano podría aumentar la eficiencia, biodegradabilidad o autodepuración de agua, favoreciendo así, la asimilación de la carga orgánica por los consorcios microbianos presentes (Pedroza et al., 2017).

E. Interacciones interespecíficas negativas o antagónicas

Este tipo de interacciones ocurre cuando una de las especies que interactúan se perjudica, mientras que la otra se beneficia o se mantiene neutra. Las interespecíficas negativas se clasifican en: competencia interespecífica que ocurre cuando dos especies compiten por los mismos recursos, predación cuando una especie se alimenta de otra de manera parcial o total, parasitismo cuando una especie vive a expensas de otra afectándola lentamente hasta causarle incluso la muerte y amensalismo cuando una especie se perjudica mientras que la otra se mantiene neutra (Erazo & Cárdenas, 2013).

F. Métodos semi-cuantitativos para determinar la actividad lipolítica

1. Agar tributirina

Es un medio nutritivo suplementado con el triglicérido tributirina el cual sirve de sustrato. El mismo forma una emulsión que aparece en el medio. Luego de la inoculación e incubación mostrará áreas claras alrededor de las colonias (lipólisis positiva), con esto se puede decir que el microorganismo es capaz de secretar lipasas (Olivas & Alarcón, 2001).

2. Degradación de la lecitina

Las lipasas tienen la capacidad de hidrolizar fosfolípidos, como los presentes en las lecitinas de la yema de huevo. El clivaje de las uniones fosfoéster por acción de la Fosfolipasa C forma un diglicérido insoluble en agua. Esta actividad enzimática puede ser detectada por una zona de opalescencia en el medio alrededor de la masa celular. Otra posible acción enzimática es la de la Fosfolipasa A, dando un producto soluble en agua (lisolecitina), que en cambio se observa como una zona transparente alrededor de la masa celular. Los fosfolípidos son componentes mayoritarios

y funcionales de las membranas celulares. La capacidad de hidrólisis de fosfolípidos de células hospedadoras es un factor importante de virulencia de las bacterias que la poseen y por lo tanto su determinación es una herramienta utilizada para caracterizar e identificar miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Clostridium* (MacFaddin, 2003).

3. Agar Rojo Neutro

El agar rojo neutro es utilizado para identificar organismos de características lipolíticas, cuando el resultado es positivo el pH baja esto se debe a la acumulación de ácidos grasos libres, la coloración del rojo se torna brillante en los lugares donde existen ácidos grasos libres (Olivas & Alarcón, 2001).

G. Estudios previos

González y colaboradores (2012) aislaron cepas bacterianas lipolíticas endógenas de un residuo graso industrial y posteriormente se trataron dicho residuo con un consorcio bacteriano preparado con cinco cepas aisladas del mismo, dos pertenecientes al género *Pseudomonas*, dos a *Bacillus* y una a *Enterobacter*, donde se logró eliminar el 90 % del volumen de residuos grasos y olores desagradables de trampas de grasa de empresas procesadoras de cerdos y aves, en 21 días a temperatura ambiente, por lo que representa una herramienta útil para el tratamiento de estos residuos.

En un estudio realizado en Casanare, Colombia en la Plantación Palmar del Oriente, se aislaron cepas nativas con actividad lipolítica de cada una de las lagunas de estabilización. De esas cepas se seleccionaron seis, las cuales presentaron mayor actividad lipolítica, tres pertenecientes al género *Pseudomonas*, una a *Enterobacter*, otra a *Bacillus* y otra a *Staphylococcus*. Con las cepas aisladas se preparó un inóculo y se realizaron pruebas en campo evaluando la remoción de grasas y aceite a partir de 8 tratamientos diferentes. A todos estos ensayos se les realizaron mediciones

de pH, temperatura y porcentaje de aceite y grasas. El inóculo mixto de bacterias logra remover, como máximo, el 40% del aceite en el ensayo con canecas de 60 litros en un tiempo de 15 días a una temperatura de 33°C y pH de $7,0 \pm 0,2$. (Otálora, Peña, Martínez, & Varela, 2013).

En el 2014, en un estudio realizado en Perú se evaluó el comportamiento de un inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* en efluentes grasos recolectados de locales de expendio de comida rápida para evaluar el medio apropiado que estimule o facilite la biodegradación de lípidos, donde se comprobó que los mejores resultados se obtienen a una temperatura de 37 °C, un tiempo de 24 horas y un pH inicial de 7 (Huané & Rivera, 2014).

En el 2016, se realizó un estudio en Ecuador, sobre la evaluación de la eficiencia de las bacterias lipolíticas de rumen de vaca para la degradación de aguas residuales con grasas y aceites, se incubaron todas las unidades en ambientes aerobios y anaerobios a una temperatura de 37 °C, por 13 y 28 días, para evaluar la demanda de oxígeno DBO₅, oxígeno disuelto, crecimiento microbiano, grasas y aceites. Se observó que el medio anaerobio fue el mejor para el desarrollo de estas bacterias ya que logró reducir en un 52% las grasas (Pazmiño, 2016).

En Guatemala, se aislaron treinta y cinco cepas con actividad lipolítica de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala, las cuales fueron caracterizadas por medio de coloración de Gram, catalasa, OFglucosa, movilidad, MacConkey, oxidasa, y API (Biomerieux®) con la finalidad de crear un cepario para estudios posteriores (Lickes, 2017). De este cepario se seleccionaron las cepas con mayor capacidad lipolítica que serán utilizadas en el presente estudio.

Aunque se han aislado y caracterizado bacterias lipolíticas en Guatemala, no existen estudios que evalúen la capacidad degradadora de aceites y grasas por medio de cepas nativas en aguas residuales.

IV. Justificación

Los lípidos, representados mayoritariamente por aceites y grasas, son componentes orgánicos que están presentes en todas las aguas residuales, que ocasionan problemas al ambiente y la salud humana. La presencia de aceite y grasa en los cuerpos de agua conduce a la formación de una capa de aceite en la superficie del agua, debido a que su densidad es inferior a la del agua, lo que conlleva a problemas tales como la reducción de la penetración de la luz hacia los cuerpos de agua, que a su vez tiene como efecto sobre el ecosistema la reducción de la fotosíntesis llevada a cabo por organismos fotosintéticos como las algas. Además, dificulta la transferencia de oxígeno de la atmósfera hacia el medio acuoso lo que produce como efecto la disminución de la cantidad del oxígeno disuelto (OD) en el fondo del cuerpo de agua y afecta negativamente la supervivencia del ecosistema acuático.

Asimismo al verter aceites y grasas en los desagües limita la reutilización de aguas residuales, genera taponamiento y pérdida de presión del agua en los sumideros y redes de alcantarillado, a su vez, las altas concentraciones de aceites y grasas derivan en malos olores, los cuales son generados por la descomposición de la alta carga de sólidos suspendidos, materia orgánica, grasas y aceites residuales, teniendo como efecto negativo la atracción de vectores (ratones, moscas), la baja calidad del efluente para ser depositados en los colectores de aguas negras y aumento de costos por inversión en infraestructura.

Ante esta problemática y debido a la falta de estudios, esta investigación propuso a las bacterias lipolíticas como una alternativa para reducir la carga lipídica. Las bacterias lipolíticas tienen la capacidad de metabolizar los lípidos, hidrolizar triglicéridos y fosfolípidos, tienen además como beneficio que se pueden obtener en gran cantidad a través de métodos sencillos y económicos, son fáciles de cultivar por sus simples exigencias nutritivas y su tiempo de generación reducido. Además, que al ser utilizadas para el tratamiento de efluentes no producen contaminación química dado que se trata de un tratamiento natural que no genera productos de desecho nocivos para el ambiente y reduce los tiempos de retención y degradación en las plantas de tratamiento de efluentes. Por lo que se demostró que el uso de bacterias lipolíticas pueden ser

una alternativa eficiente para la reducción de aceites y grasas en aguas residuales y poder así contribuir en la reducción de la contaminación de los cuerpos de agua de nuestro país.

V. Objetivos

A. Objetivo general

Determinar la eficiencia de degradación de grasas y aceites por parejas de cepas bacterianas aisladas de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala, en muestras provenientes de agua residual.

B. Objetivos específicos

1. Seleccionar las cepas bacterianas aisladas de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala con mayor capacidad lipolítica, a través de los halos de hidrólisis producidos in vitro en agar tributirina.
2. Determinar la relación antagónica entre parejas de cepas bacterianas con mayor capacidad lipolítica.
3. Determinar la eficiencia de degradación de grasas y aceites de parejas bacterianas no antagónicas en agua residual.

VI. Hipótesis

- Al menos una cepa bacteriana aislada de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala producirá halos de hidrólisis en agar tributirina.
- Al menos una pareja de cepas bacterianas no presentará relación antagónica.
- Al menos una pareja de bacterias reducirá la concentración de grasas y aceites en muestras de aguas residuales.

VII. Materiales y métodos

A. Universo de Trabajo

1. Universo

Cepas bacterianas aisladas de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

2. Muestra

35 Cepas bacterianas que presentan halos de lipólisis de mayor tamaño al ser probadas en agar tributirina.

3. Criterios de inclusión

- Cepas bacterianas que se encuentran identificadas.
- Cepas bacterianas que presenten los mayores halos de hidrólisis.

4. Criterios de exclusión

- Cepas bacterianas que se desconoce su identificación.

B. Recursos

1. Recursos humanos

a. Asesores

- Asesor: M.Sc. Sergio Alfredo Lickes
- Asesor estadístico: Dr. Jorge Luis de León Arana

b. Seminaristas

- Lesly Celina Suchini Moscoso
- Shirley Carolina Carrera Monterroso

2. Institucionales

Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-.

Laboratorios del Departamento de Microbiología.

Departamento de Análisis Estadístico e Informática del Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas -IIQB-, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Unidad de Análisis Instrumental (UAI), Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

3. Materiales

a. Equipos

Autoclave

Balanza analítica

Cabina de bioseguridad, clase 2

Esterilizador de Asas Bacteriológicas

Estufa

Incubadora a 35°C

Refrigeradora

Frascos de vidrio de 1.25 L

b. Reactivos

Agar Trypticase soya

Agar Nutritivo

Agua desmineralizada

Alcohol al 70%

Tributirina

Tween 80

c. Instrumentos

Asa de nicromo en argolla y en punta

Pinzas

Erlenmeyers de 1000 mL

Cajas de Petri simples

Probeta de 1000 mL

Regla graduada en milímetros

Pipeta automática

Recipientes de Vidrio

d. Insumos

Algodón

Puntas de pipetas

Guantes

Bolígrafos

C. Enfoque y tipo de investigación

El estudio fue de tipo experimental. Se evaluó la capacidad degenerativa de grasas y aceites por bacterias lipolíticas aisladas de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

D. Métodos

1. Revitalización de las cepas

Las 35 cepas que se encontraban almacenadas en agar stock con aceite mineral, se sembraron en placas con agar Tripticasa Soya por duplicado para recuperarlas, se incubaron a 25°C por 24–48 ± 2 horas.

2. Evaluación de la actividad lipolítica

Las 35 cepas bacterianas se inocularon en Agar Nutritivo suplementado con Tributirina (1%) y Tween 80 (1%). Para ello se tomó con asa en punta cada colonia y se sembró por punción, con el fin de facilitar la lectura de los halos de hidrólisis, luego se incubó a 25°C por 72 horas y se realizó lecturas de los halos de hidrólisis cada 24 horas. La aparición de un halo transparente alrededor de la colonia (Anexo 3) fue indicativo de la presencia de enzimas lipolíticas (Anderson, 1939). Las cepas bacterianas que presentaron los mayores halos de hidrólisis en el agar tributirina se seleccionaron para ser utilizadas en las siguientes fases.

Para determinar el diámetro del halo de hidrólisis se utilizó la siguiente ecuación:
 $A = B - C$. En donde: A corresponde al diámetro del halo de hidrólisis, B al diámetro de la colonia más el halo de hidrólisis en mm y C al diámetro de la colonia en mm. (Cepeda & Valencia, 2007).

3. Evaluación de la actividad antagónica

A partir de las cepas seleccionadas, es decir aquellas que presentaron mayor halo de hidrólisis se evaluó la actividad antagónica, con el fin de determinar la posible competencia entre las cepas y así evitar una relación negativa entre ellas al momento de ser puestas a prueba en agua residual.

La evaluación in vitro de antagonismo entre las bacterias se realizó mediante la determinación de inhibición de crecimiento entre estas, realizándose 5 veces, a través del método de botón en césped de Bauer, sustituyendo el agar Müller Hinton por agar tripticasa soya, donde se enfrentaron por pareja, inoculando 0.1 ml con una concentración de 10^8 UFC/mL de una de las dos cepas seleccionadas, la cual se extendió masivamente sobre la superficie del medio; de la otra cepa se inoculó 10 uL a una concentración de 10^8 UFC/mL en un disco de papel filtro, finalmente se enfrentaron los discos impregnados, con las cepas sembradas en las placas de agar tripticasa soya; de tal modo que todas las cepas fueron enfrentadas entre sí, posterior se incubaron a 25°C por 24 horas. Para la interpretación de los resultados se tuvo en cuenta la presencia o ausencia de halos de inhibición reportados en milímetros (mm) (Moreno, 2017).

4. Determinación de la eficiencia de la degradación de grasas en aguas residuales

Se puso a prueba la capacidad de lipólisis de las cepas y pares de cepas que presentaron los mayores halos de hidrólisis en la fase de evaluación de la capacidad lipolítica y que no presentaron ninguna relación de antagonismo.

a. Toma de Muestra de agua residual

Se tomaron 45 litros de agua residual sin tratamiento (agua residual cruda) de una fábrica de embutidos en envases de vidrio con tapadera de plástico, de los cuales 5 litros sirvieron como control para realizar la medición basal de grasas y aceites presentes en dicha agua y 5 litros de agua residual por cada pareja de cepas que se evaluó.

La muestra de agua residual se tomó de la corriente de descarga del efluente. Los frascos que se utilizaron fueron de vidrio con tapadera de plástico, boca ancha y con una capacidad de 1.25 L. Todos los frascos fueron previamente identificados con el número de muestra, fecha y hora en que se tomó la muestra; identificación de la descarga y tipo de análisis que se realizó. Luego se sumergió el frasco y se llenó hasta llegar al volumen de un litro. La muestra se tomó de un solo

golpe, para evitar que se derramará y no se perdieran las grasas y aceites, asimismo se evitó que la “nata” se adhiriera a la tapa del frasco (Rice, Baird, & Eaton, 2017)

b. Inoculación de los pares de cepas

A cada litro de agua residual se le inoculó los pares de cepas, cada una de las cepas a una concentración de 10^{10} UFC/mL, los litros previamente inoculados con las dos cepas bacterianas se incubaron por 15 días a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se le realizó la medición de la concentración grasa y aceites.

c. Medición de grasas y aceites

Esta medición se llevó a cabo en la Unidad de Análisis Instrumental (UAI) dependencia de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos De Guatemala, se extrajeron las grasas y los aceites utilizando como disolvente hexano. La muestra se acidificó con Ácido clorhídrico (HCl) en una relación 1:1 o con ácido sulfúrico (H_2SO_4) en una relación igual de 1:1 donde alcanzó un pH de 2 o más bajo, la muestra se transfirió a una ampolla de separación, se hizo lavados a la botella que contiene el agua residual, con 30 mL de hexano, esto se agitó durante 2 minutos, se esperó que se separen las dos fases (fase acuosa y fase orgánica) se drenó la fase acuosa y la fase orgánica se transfirió a otro recipiente, esta última se pasó por un embudo que contenía papel filtro con 10 g de Sulfato de Sodio (Na_2SO_4) el filtrado se recogió en otro recipiente limpio una vez terminada la extracción el hexano se evaporó y se pesó el residuo que ha quedado en el recipiente; este valor representa el contenido de grasas y aceites (Rice, Baird, & Eaton, 2017).

Con la medición de grasas y aceites se determinó la eficiencia (E) de remoción de estos compuestos en el tratamiento de aguas residuales por medio de la siguiente ecuación:

$$E = (S_0 - S) / S_0 \times 100.$$

En donde:

E = eficiencia de remoción de grasas y aceites expresada como porcentaje (%)

S₀ = carga contaminante de entrada (mg/L de grasas y aceites)

S = carga contaminante de salida (mg/L de grasas y aceites) (Romero, 1999)

Adicionalmente se midió la temperatura y el pH a todas las muestras y controles.

E. Análisis estadístico

Para la fase de selección de cepas y la determinación de la relación antagónica entre parejas de cepas bacterianas se empleó un análisis estadístico descriptivo.

Los datos obtenidos de la eficiencia de degradación de grasas y aceites de las parejas bacterianas no antagónicas en agua residual se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), la comparación de medias se realizó mediante el método de Tukey ($P \leq 0.05$), utilizando el paquete estadístico STATA y Excel.

VIII. Resultados

Este estudio se llevó a cabo en tres fases, la primera consistió en la medición de la capacidad lipolítica de 35 cepas bacterianas aisladas de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala, mediante la medición de halos de hidrólisis en agar tributirina a través del método de difusión en agar.

El 25% (9) de las cepas puestas a prueba no presentaron ninguna actividad enzimática lipolítica en agar nutritivo suplementado con Tween 80 (1%) y Tributirina (1%), a temperatura ambiente; mientras que el 75% (24) de las cepas si presentaron actividad enzimática lipolítica bajo las mismas condiciones. Las cepas que presentaron halos de hidrolisis mayores a 10 mm de diámetro corresponden a *Pasteurella* sp., *Pseudomonas alcaligenes*, *Burkholderia arboris*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus coagulans*. *Pasteurella* sp., *Pseudomonas alcaligenes* y *Burkholderia arboris* presentaron halos de hidrólisis de 11.0 (0.4) mm de diámetro; *Pseudomonas fluorescens* presentó halo de hidrólisis de 14.0 (0.4) mm de diámetro, el cual corresponde al halo de hidrólisis de mayor tamaño y *Bacillus coagulans* la cual presentó halo de hidrólisis de 12.0 (0.4) mm de diámetro (Tabla 1).

Tabla 1

Actividad enzimática lipolítica *in vitro*, de las cepas bacterianas aisladas de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Cepa	Origen	Identificación	Diámetro del halo de hidrólisis (mm) ¹
012017	Sedimentador primario	<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>	6.0 (0.5)
022017		Cepa 022017	1.0 (0.3)
032017		Cepa 032017	0.0 (0.0)
042017		<i>Serratia marcescens</i>	0.0 (0.0)
052017	Filtro percolador fase I	<i>Pasteurella</i> sp.	11.0 (0.4)
062017		<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2.0 (0.4)
072017		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0 (0.0)
082017	Filtro percolador fase II	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0.0 (0.0)
092017		Cepa 092017	1.0 (0.2)
102017		<i>Aeromonas sobria</i>	4.0 (0.4)
112017		<i>Pseudomonas putida</i>	0.0 (0.0)
122017	Filtro percolador fase III	Cepa 122017	6.0 (0.8)
132017		<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	0.0 (0.0)
142017		Cepa 142017	5.0 (0.6)
152017	Sedimentador secundario	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	0.0 (0.0)
162017		<i>Pasteurella</i> sp.	7.0 (0.4)
172017	Sedimentador primario	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	11.0 (0.5)
182017		Cepa 182017	2.0 (0.5)
192017	Filtro percolador fase I	<i>Pasteurella aerogenes</i>	0.0 (0.0)
202017		Cepa 202017	8.0 (0.8)
212017		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	14.0 (0.4)
222017	Filtro percolador fase II	Cepa 222017	2.0 (0.5)
232017		Cepa 232017	7.0 (0.4)
242017	Filtro percolador fase III	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	5.0 (0.4)
252017		Cepa 252017	3.0 (0.5)
262017		<i>Burkholderia arboris</i>	11.0 (0.5)
272017	Sedimentador primario	Cepa 272017	5.0 (0.4)
282017		Cepa 282017	2.0 (0.6)
292017		Cepa 292017	2.0 (0.5)
302017		<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria</i>	2.0 (0.4)
312017		<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>	3.0 (0.4)
322017	Filtro percolador fase II	<i>Bacillus coagulans</i>	12.0 (0.4)
332017		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.0 (0.0)
342015		Cepa 342017	4.0 (0.4)
352017	Filtro percolador fase III	<i>Chromobacterium violaceum</i>	4.0 (0.5)

¹Media (desviación estándar) en milímetros.

En la segunda etapa se evaluó la relación de antagonismo de las 5 cepas que presentan mayor halo de hidrólisis en la etapa de selección, con el fin de evaluar la posible competencia entre las cepas seleccionadas al momento de ser puestas a prueba en la degradación de grasa y aceites; El 20% (2) de los pares de cepas presentaron antagonismo al ser probadas; el par *Pasteurella* sp./*Pseudomonas fluorescens* presentó un halo de inhibición de 8.0 (0.8) mm, mientras que el par *Pseudomonas alcaligenes*/*Pseudomonas fluorescens* presentó un halo de inhibición de 11.0 (0.5) mm, el otro 80% (8) de los pares de cepas no presentaron ninguna evidencia de antagonismo al ser puestas a prueba.

Por último, se evidenció la actividad enzimática lipolítica en el tratamiento de aguas residuales a través de la medición de la concentración de grasas y aceites 15 días después de la adición de las cepas bacterianas que presentaron resultados favorables en todas las etapas previas del análisis. La muestra de agua residual obtenida de la fábrica de embutidos (control) presentó una concentración de grasas y aceites de 262.6 (11.3) mg/L, un pH de 6.58 y una temperatura de 23.2 °C a los 15 días de incubación. Las muestras de agua en las que se inocularon los pares *Pasteurella* sp./*Bacillus coagulans* y *Pseudomonas alcaligenes*/*Bacillus coagulans* presentaron concentraciones de grasas y aceites de 136.6 (1.8) mg/L y 109.0 (7.2) mg/L respectivamente. El par *Pseudomonas alcaligenes*/*Burkholderia arboris* presentó una concentración de 23.6 (8.2) mg/L, este par fue el que redujo en mayor cantidad la concentración de grasas y aceites presentes en la muestra de agua residual (mejor porcentaje de eficiencia). En cuanto a los pares de cepas *Burkholderia arboris*/*Bacillus coagulans* y *Pseudomonas fluorescens*/*Burkholderia arboris* degradaron 35.0 (6.5) mg/L (Tabla 2).

La prueba de Tukey realizada estableció que las parejas que mostraron mayor actividad se encontraban conformadas por los pares de cepas bacterianas *Pseudomonas fluorescens*/*Burkholderia arboris* y *Burkholderia arboris*/*Bacillus coagulans*, esto debido a que ambas parejas degradaron la misma cantidad de grasas y aceites. Mientras que los que presentaron diferencias estadísticas con las demás parejas fueron *Pasteurella* sp./*Bacillus coagulans* y *Pseudomonas alcaligenes*/*Bacillus coagulans*, ya que fueron las parejas que no redujeron en alto porcentaje la concentración de grasas y aceites.

Tabla 2

Eficiencia de la degradación de grasas en aguas residuales

Parejas bacterianas	Concentración de grasas y aceites alcanzada (mg/L)¹	Eficiencia (%)	pH	Temperatura (°C)
Control	262.6 (11.3) a ²	-	6.58	23.2
<i>Pasteurella</i> sp./ <i>Bacillus coagulans</i>	136.6 (1.8) b	48.0%	7.71	25.7
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> / <i>Bacillus coagulans</i>	109.0 (7.2) c	58.4%	7.82	25.8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>Bacillus coagulans</i>	62.4 (11.7) d	76.2%	7.66	25.5
<i>Burkholderia arboris</i> / <i>Bacillus coagulans</i>	35.0 (6.5) e	86.7%	6.84	25.3
<i>Pasteurella</i> sp./ <i>Burkholderia arboris</i>	31.0 (3.6) f	88.1%	7.19	25.2
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> / <i>Burkholderia arboris</i>	23.6 (8.2) g	91.0%	7.88	25.3
<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>Burkholderia arboris</i>	35.0 (3.5) e	86.7%	7.27	25.2
<i>Pasteurella</i> sp./ <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	53.2n(15.8) h	79.7%	7.99	25.0

¹ Media (desviación estándar) en miligramos por litro² Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de comparación múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$).

IX. Discusión de resultados

Se midió la intensidad de lipólisis de 35 cepas bacterianas en agar Trypticase soya suplementado con Tributirina (1%) y Tween 80 (1%) (Tabla 1, Anexo 5). El medio suplementado con tributirina fue utilizado ya que permite demostrar las lipasas en diversas especies bacterianas como, por ejemplo, *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. entre otros (Otálora et al., 2013). La hidrólisis en este medio indica la presencia de esterasas; las esterasas hidrolizan el gliceril tributirato del medio lo que genera la formación de halos transparentes alrededor de las colonias indicando la presencia de enzimas lipolíticas excretadas al medio por el microorganismo puesto a prueba (Lizano, 2012). Del total de las cepas analizadas solo el 75% presentó actividad enzimática lipolítica; Lizano 2012, reporta que cepas de *Pseudoalteromonas atlantica* que poseen actividad enzimática lipolítica inherente, al ser probada en medios enriquecidos con Tween 80 no presentan ninguna o poca actividad lipolítica, debido principalmente a que las esterasas o falsas lipasas poseen la capacidad de hidrolizar ésteres y triacilglicéridos de cadena corta como la tributirina pero no así los de cadena larga como lo es el Tween 80, lo que podría explicar lo sucedido con el 25% de las cepas que no presentaron actividad lipolítica.

Aunque existen reportes que indican que cepas del género *Bacillus* son los mejores productores de enzimas lipolíticas y las más adecuadas para degradar residuos grasos (Rivera y García, 2007), Hasanuzzaman y colaboradores (2004) señalan que microorganismos del género *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Burkholderia*, son también capaces de degradar residuos grasos, pero su actividad lipolítica es baja debido a que los ácidos grasos de cadenas largas, productos de la hidrólisis enzimática, se acumulan en el medio limitando dicha actividad. En nuestro caso, bajo las condiciones experimentales utilizadas, no parece haber diferencias notables entre los géneros bacterianos evaluados, en términos de producción de lipasas e hidrólisis de residuos grasos. Para este estudio *Pasteurella* sp., 11.0 (0.4) mm, *Pseudomonas fluorescens*, 14.0 (0.4) mm, *Burkholderia arboris*, 11.0 (0.5) mm, *Pseudomonas alcaligenes*, 11.0 (0.5) mm y *Bacillus coagulans*, 12.0 (0.4) mm, fueron los que presentaron mayor intensidad de lipólisis.

Por otra parte el antagonismo microbiano está dado por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos deletéreos o negativos a la otra. *Pseudomonas fluorescens* presentó efectos antagónicos con las cepas de *Pasteurella* sp. y *Pseudomonas alcaligenes* (Anexo 6), esto se debe a que el género *Pseudomonas* es capaz de producir metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de otras bacterias, así como de enzimas extracelulares incluyendo lipasas y amilasas. Además, los miembros de este género se encuentran involucrados en la biodegradación tanto de compuestos naturales como de componentes químicos. Otros factores que pudieron influir es la competencia por nutrientes, variación de las condiciones como el pH y la disponibilidad de oxígeno (Pérez, González, & Muñoz, 2014). El resto de las parejas bacterianas no mostraron antagonismo entre sí, es decir, que no contrarrestan su actividad y crecimiento, por lo que se utilizaron para evaluar su capacidad en la degradación de grasas y aceites en aguas residuales.

Así mismo con el par de cepas bacterianas conformado por *Pseudomonas alcaligenes* y *Burkholderia arboris* se obtuvo una eficiencia del 91% en la remoción de grasas y aceites (Tabla 2), lo que demuestra que pueden degradar este tipo de residuo, excretando al medio enzimas lipolíticas que actúan en condiciones acuosas sobre el éster carboxílico, rompen enlaces presentes en triacilgliceroles para liberar ácidos grasos y glicerol, posteriormente estos ácidos grasos son absorbidos por células microbianas y convertidos en acetyl-CoA a través de la vía de β -oxidación. Generalmente las lipasas son secretadas por los microorganismos y la hidrólisis de triglicéridos ocurre extracelularmente (Matsuoka, Miura, & Hori, 2009). Es importante mencionar que las aguas residuales utilizadas en este estudio; provienen de una procesadora de embutidos y que además de contener grasas, también contienen carbohidratos, proteínas y otros componentes que, eventualmente podrían coadyuvar a la viabilidad de la población microbiana presente. Sin embargo, bajo estas condiciones, las bacterias fueron capaces de degradar en un alto porcentaje la grasa contenida en dicha agua. Asimismo, se observó que las parejas bacterianas que contenían a *Burkholderia arboris* fueron las que presentaron mayor actividad esto se debe a que la lipasa de *Burkholderia* resiste a los agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno e hipoclorito sódico, así como a las proteasas, es estable a temperaturas elevadas hasta 90°C, su pH óptimo es de 10-11 y en pH alcalinos no parece suponer un problema para la actuación de la lipasa (García, 2005).

Simultáneo a la medición de grasa, se realizó la medición de pH y temperatura antes y después de 15 días de incubación, en donde se observó que a medida que pasaba el tiempo el medio se alcalinizaba, indicando la actividad de las bacterias al utilizar el sustrato graso y degradarlo a ácidos grasos, liberando CO₂ y agua. El CO₂ que se forma durante el proceso de descomposición pudo liberarse como gas o disolverse en forma líquida como ácido carbónico, bicarbonato y carbonato, las cuales tienden a alcalinizar el medio, aumentando el pH (Barrera, 1999). Normalmente las lipasas son más eficientes a pH alcalino debido a la mejor solubilización de los productos de hidrólisis formados. Por otro lado, el pH afecta a la actividad enzimática, de forma diferenciada según la enzima de que se trate, *Burkholderia cepacia* tienen un pH óptimo de alrededor de 10 – 11 (Lizano, 2012).

Por último, se sabe que la eliminación de grasas in situ por acción de las lipasas es extremadamente dependiente de la temperatura, ya que afecta al estado de agregación de la grasa y a la actividad de la enzima. La actividad lipásica aumenta con la temperatura alcanzando su actividad óptima junto con temperatura óptima de crecimiento de la bacteria (Lizano, 2012) Con lo que se puede decir que a 25 °C las parejas bacterianas fueron estables y presentaron actividad enzimática lipolítica.

X. Conclusiones

Las cepas bacterianas aisladas de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala que presentaron los mayores valores medios de halos de degradación fueron *Pasteurella* sp., 11.0 (0.4) mm, *Pseudomonas fluorescens*, 14.0 (0.4) mm, *Burkholderia arboris*, 11.0 (0.5) mm, *Pseudomonas alcaligenes*, 11.0 (0.5) mm y *Bacillus coagulans*, 12.0 (0.4) mm.

La cepa *Pseudomonas fluorescens* presentó efectos antagónicos frente a las cepas de *Pasteurella* sp. y *Pseudomonas alcaligenes*.

La pareja bacteriana conformado por *Pseudomonas alcaligenes* y *Burkholderia arboris* mostró una eficiencia del 91% en la remoción de grasas y aceites presentes en la muestra de agua residual proveniente de la fábrica de embutidos.

XI. Recomendaciones

Continuar con los estudios de caracterización de microorganismos lipolíticos a fin de encontrar otros microorganismos que promuevan mejores rendimientos en la degradación de lípidos y que sean favorables para su aplicación en el tratamiento de aguas residuales.

Proponer parámetros que contribuyan a mejorar los rendimientos en los procesos de tratamientos de aguas residuales para así reducir el impacto frente a la naturaleza en especial los lechos marinos y acuíferos.

Considerar otros rangos de temperatura, pH a los ya trabajados y probarlos con aquellas bacterias aisladas y que se determinaron en este estudio con escasa actividad lipolítica.

XII. Referencias bibliográficas

- Abass, O., Ahmad, T., Suleyman, A., Mohamed, I., & Zahangir, A. (2011). Removal of Oil and Grease as Emerging Pollutants of Concern (EPC) in Wastewater Stream. *Engineering Journal*, 12(4), 161-169. doi: 10.31436/iiumej.v12i4.218
- Aceves, D., & Castañeda, L. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae*, 19(3), 1-3.
- Anderson, J. (1939). The use of tributyrin agar in dairy bacteriology. *International Microbiology Congress*, 3(3), 726-728.
- Argueso, A., Diaz, J., Diaz, P., Rodríguez, A., Castro, M., & Diz, F. (2011). Lípidos, colesterol y lipoproteínas. *Galicia Clínica*, 72(1), 7-17.
- Bailey, A. (2001). *Aceites y grasas industriales*. México: Editorial Reverté.
- Barrera, S. (1999). *Introducción a la problemática del medio ambiente*. Santafé de Bogotá: Universidad de los Andes
- Cabezas, C., Hernández, B., & Vargas, M. (2015). Aceites y grasas: efectos en la salud y regulación mundial. *Revista de la Facultad de Medicina*, 64(4), 761-768. doi: 10.15446/revfacmed.v64n4.53684
- Cepeda, L., & Valencia, S. (2007). *Aislamiento de Bacterias lipolíticas y determinación de patógenos humanos Escherichia coli y Salmonella sp. A partir de residuos orgánicos domiciliarios en compostaje*. (Tesis de licenciatura). Pontifica Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Chumbita, N. (2017). *Caracterización y propuesta de tratamiento para efluentes líquidos generados en la elaboración de aceite de oliva en la Planta Piloto de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.
- Devlin, T. (2004). *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas*. (4ª Ed.). Barcelona: Reverté.
- Erazo, M. & Cárdenas, R. (2013). *Ecología: Impacto de la problemática ambiental actual sobre la salud y el ambiente*. (1ª Ed.). Bogotá: ECOE Ediciones.

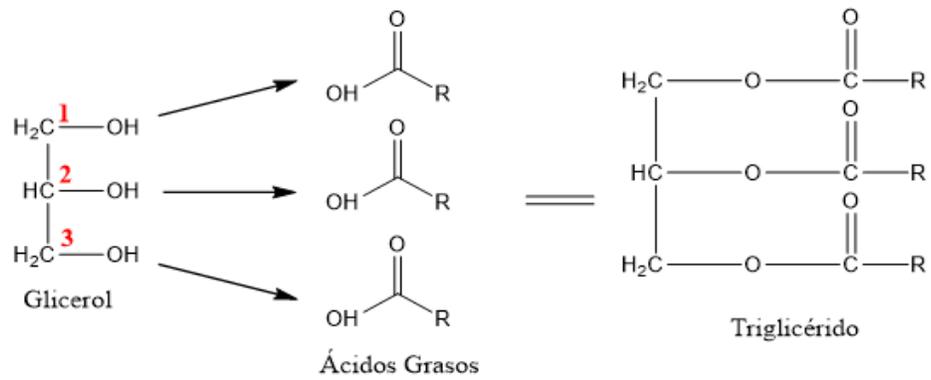
- Estrada, M. (2012). *Comparación de cinco métodos analíticos para determinar la calidad de la caña de azúcar*. (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- García, M. (2005). *Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones o/w. Aplicación a formulaciones detergentes*. (Tesis de doctorado). Universidad de Granada, Granada.
- González, D., Amaíz, L., Medina, L., Vargas, R., Izzeddin, N., & Valbuena, O. (2012). Biodegradación de residuo graso industrial empleando bacterias endógenas. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Alga*, 3(2), 105-118.
- Hasanuzzaman, M., Umadhay-Briones, K., Zsiros, S., Morita, N., Nodasaka, Y., Yumoto, I., & Okuyama, H. (2004). Isolation, Identification and Characterization of a Novel, OilDegrading Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. *Current Microbiology*, 49(2), 108-114. doi: 10.1007/s00284-004-4267-x
- Huané, L., & Rivera, R. (2014). *Evaluación de la adición de un inóculo para estimular a escala de laboratorio la biodegradación de efluentes grasos*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Koolman, J., & Rohm, K. (2004). *Bioquímica: Texto y atlas*. (3ª Ed.). Madrid: Médica Panamericana.
- Lizano, O. (2012). *Caracterización Bioquímica de la actividad Lipolítica de Pseudoalteromonas Atlantica Aislada de la Bahía de Paracas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Lickes, S. (2017). *Aislamiento y Caracterización de bacterias lipolíticas en aguas residuales de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de San Carlos de Guatemala*. (Tesis de maestría). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. (3ª Ed). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Matsuoka, H., Miura, A., & Hori, K. (2009). Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107 (4), 401-408. doi: 10.1016/j.jbiosc.2008.12.001

- Mora, L., & Valencia, H. (2006). Aislamiento y caracterización de microorganismos con actividad lipolítica provenientes de sedimentos del Humedal El Jaboque. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 108-110.
- Moreno, C. (2017). *Evaluación de antagonismo y sinergismo en aislados microbianos obtenidos de Plukenetia volúbilis para la conformación de un consorcio microbiano en condiciones in vitro*. (Tesis de licenciatura). Universidad de Santander, Colombia
- Navarro, I., & Periago, M. (2012). Enzimas Lipolíticas bacterianas: Propiedades, Clasificación, Estructura, Aplicaciones Tecnológicas y Aspectos legales. *Anales de veterinaria de Murcia*, 28(12), 45-65. doi: 10.6018/j/188711
- Nemerow, N., & Dasgupta, A. (1998). *Tratamiento de Vertidos Industriales y Peligrosos*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos, S.A.
- Olivas, E., & Alarcón, L. (2001). *Manual de prácticas de Microbiología básica y microbiología de alimentos*. México: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- Otálora, M., Peña, J., Martínez, M., & Varela, A. (2013). Evaluación de la capacidad degradadora de aceite por bacterias lipolíticas en el lodo residual de la extracción de aceite de palma. *Revista Palmas*, 21(1), 83-294.
- Pazmiño, Y. (2016). *Evaluación de la eficiencia de las bacterias lipolíticas de rumen de vaca para la degradación de aguas residuales con grasas y aceites*. (Tesis de licenciatura). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Pedroza, C., Romero, M., & Orduz, S. (2017). Actividad lipolítica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminadas con grasas. *Bioteología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 15(1), 36-44.
- Pérez, R., González, M., & Muñoz, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3), 53-60.
- Rice, E., Baird, R., & Eaton, A. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (23rd Ed.). Washington: American Public Health Association.
- Rivera, C., & García, F. (2007). Enzimas Lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. *Bioteología*, 11(2), 37-43.

- Rodrigo, L. (2013). *Estrategias de identificación de genes de proteasas en una cepa de Pseudomonas fluorescens alterante de leche*. (Tesis de Maestría). Universidad de Oviedo, Oviedo, España.
- Romero, J. (1999). *Tratamiento de Aguas Residuales. Teoría y principios de diseño*. (3^a Ed). Bogotá: Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería.
- Vidales, A., Leos, M., & Campos, M. (2010). Extracción de grasas y Aceites en los Efluentes de una Industria Automotriz, *Conciencia Tecnológica*. 40(1), 29-34.

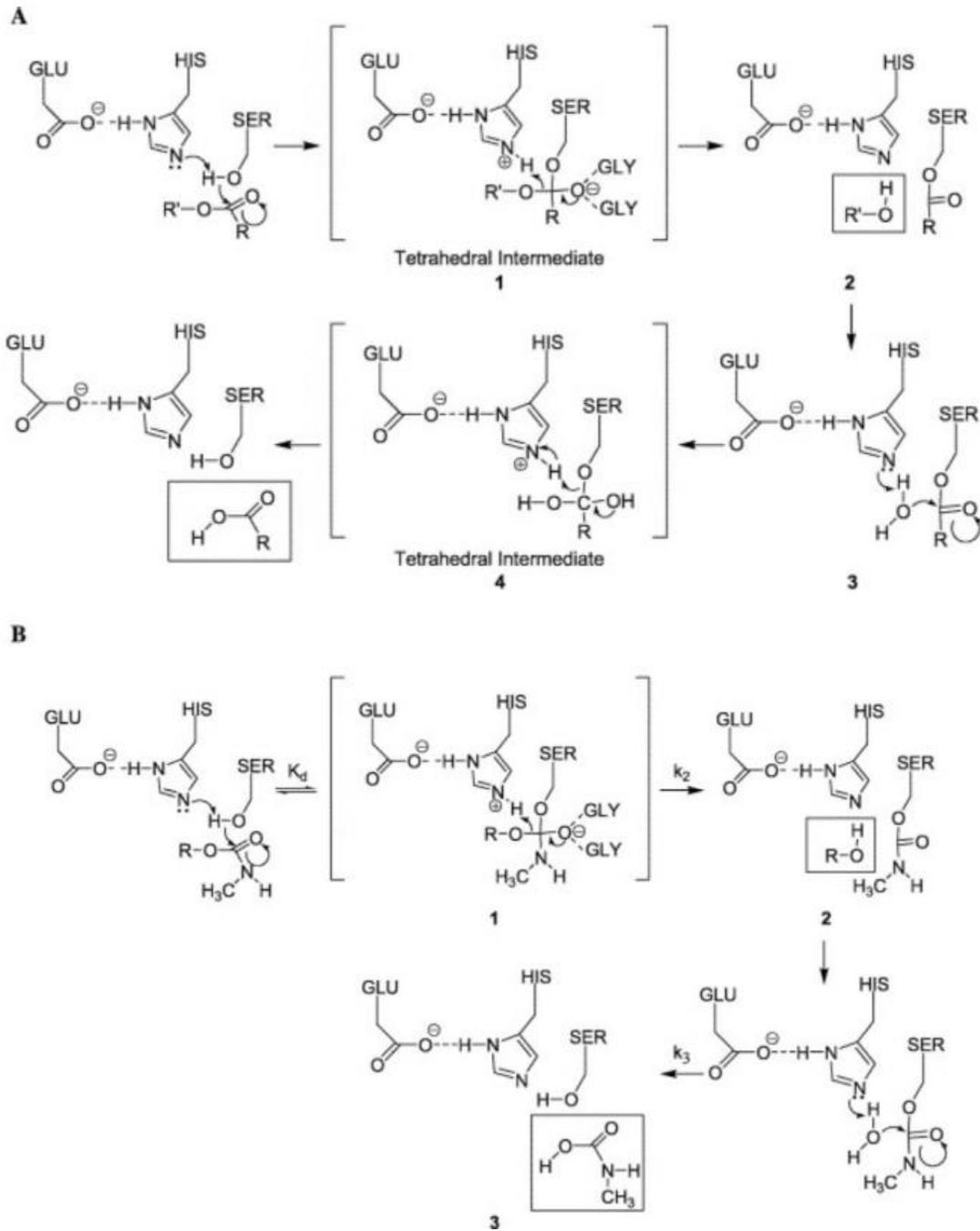
XIII. Anexos

Anexo 1. Estructura del triglicérido



(Bailey, 2001)

Anexo 2. Mecanismo de Acción de las enzimas lipolíticas



Anexo 3. Agar tributirina. Se observa halo claro de hidrólisis en colonias con actividad lipolítica

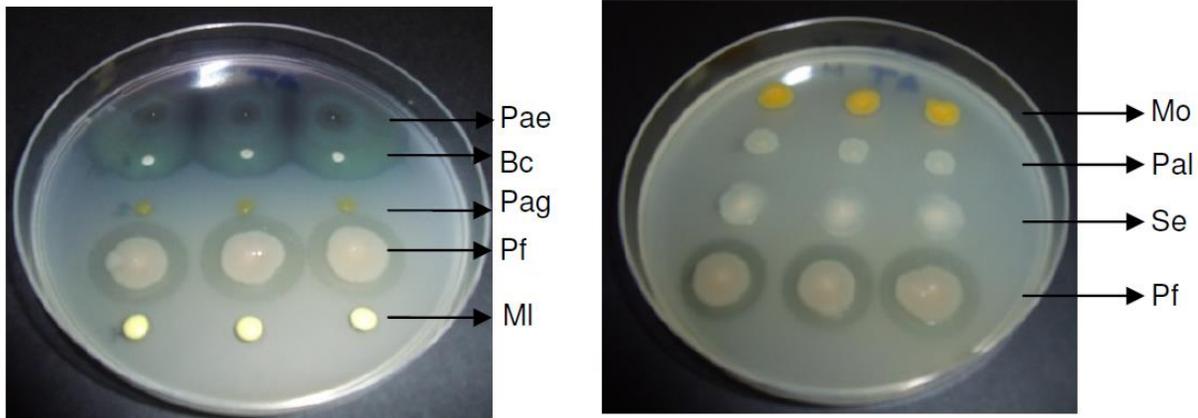


Figura 1. A) Control positivo, *Pseudomonas aeruginosa* (Pae); control negativo, *Bacillus cereus* (Bc). La zona de crecimiento de *P. aeruginosa* y el halo de lipólisis se solapan con la zona de crecimiento de *B. cereus*; *Pantoea agglomerans* (Pag; negativa); *Pseudomonas fluorescens* (Pf; positiva); y *Micrococcus luteus* (MI; negativo). B) *Myroides* (Mo; negativo); *Providencia alcalifaciens* (Pal; negativa); *Staphylococcus epidermidis* (Se; negativo); *Pseudomonas fluorescens*, utilizada aquí como control positivo (Rodrigo, 2013)

Anexo 4. Agrupación en pares de las cepas problema para la prueba de Antagonismo.

Cepa	No.1	No.2	No.3	No.4	No. 5	...
...	...+1	...+2	...+3	...+4	...+ 5	
No.5	5+1	5+2	5+3	5+4		
No.4	4+1	4+2	4+3			
No.3	3+1	3+2				
No.2	2+1					

Anexo 5. Halos de hidrólisis de las 5 cepas seleccionadas por presentar halos mayores a 10 mm de diámetro en agar tripticasa soya suplementado con Tributirina (1%) y Tween 80 (1%).

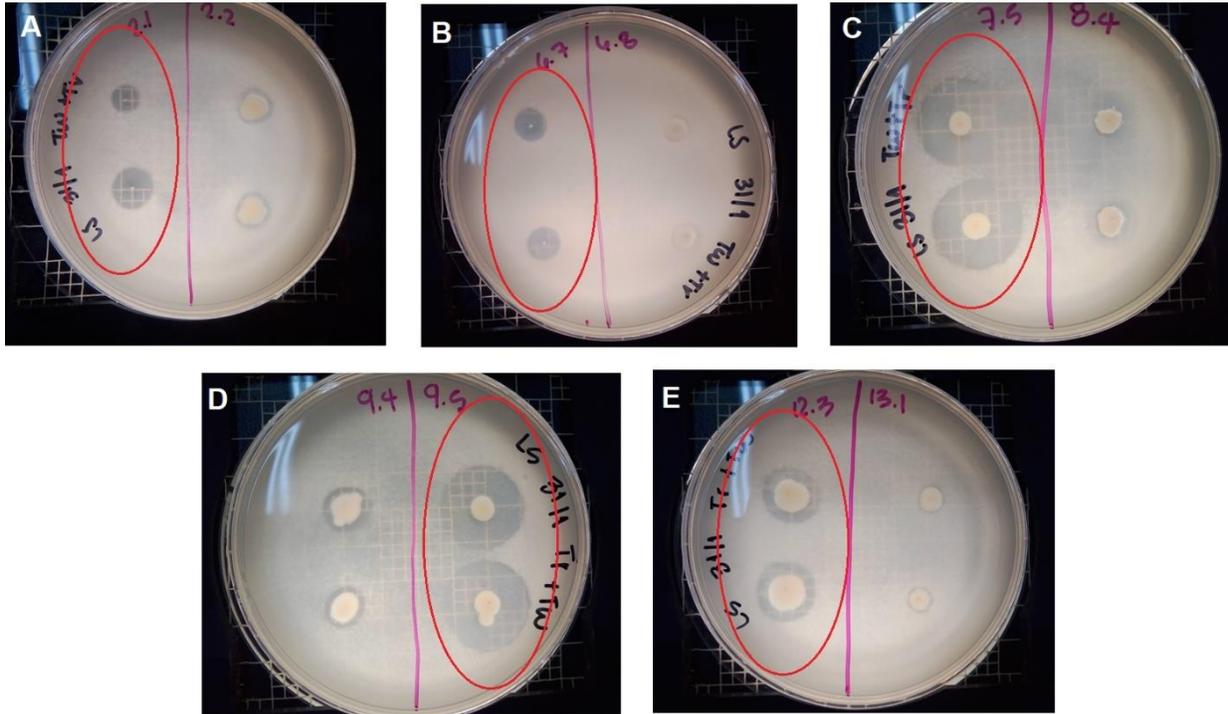


Figura 2. Las zonas en donde el medio se observa translúcido corresponden a los halos de hidrólisis producidos por las enzimas lipolíticas de las bacterias puestas a prueba. A. *Pasteurella* spp. la cual produjo un halo de hidrólisis de 11 mm de diámetro; B. *Pseudomonas alcaligenes* con un halo de 11 mm de diámetro; C. *Pseudomonas fluorescens* con un halo de 14 mm de diámetro; D. *Burkholderia arboris* con un halo de 11 mm de diámetro y E. *Bacillus coagulans* con un halo de 12 mm de diámetro.

Anexo 6. Relación de antagonismo entre las cepas seleccionadas

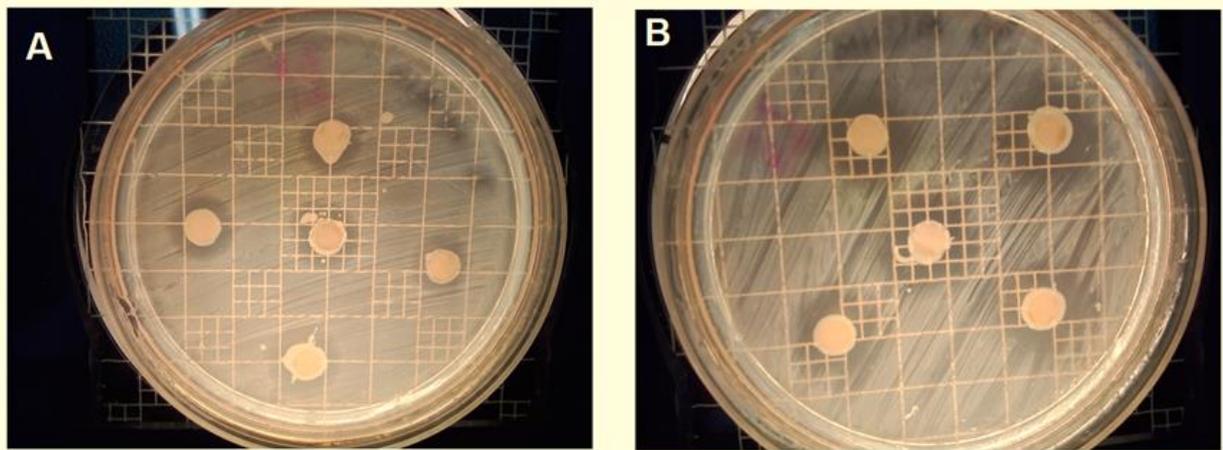
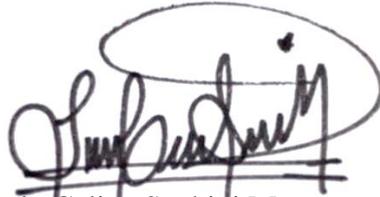


Figura 3. En la imagen A. se observa la relación antagónica entre *Pseudomonas fluorescens* y *Pasteurella sp.* Con un halo de inhibición de 8 mm de diámetro Y en B. se observa la relación antagónica entre *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas alcaligenes* con un halo de inhibición de 11 mm de diámetro.



Lesly Celina Suchini Moscoso
Autor



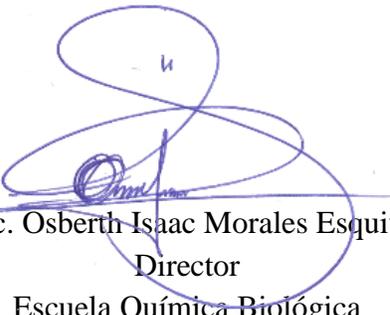
Shirley Carolina Carrera Monterroso
Autor



M.Sc. Sergio Alfredo Lickes
Asesor



Lic. Ricardo Andres Figueroa Ceballos
Revisor



MSc. Osberth Isaac Morales Esquivel
Director
Escuela Química Biológica



M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto
Decano
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia