
Detección de cepas bacterianas productoras de lipasas extracelulares termoestables y pH-estables extraídas de suelo de caña de azúcar con potencial para su aplicación en un consorcio destinado a la degradación de residuos grasos

Diana Gabriela Moya Mendoza



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Detección de cepas bacterianas productoras de lipasas extracelulares termoestables y pH-estables extraídas de suelo de caña de azúcar con potencial para su aplicación en un consorcio destinado a la degradación de residuos grasos

Trabajo de graduación presentado por Diana Gabriela Moya Mendoza para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2025

Vo.Bo.:


(f) 

PhD. Krisztina Ríos

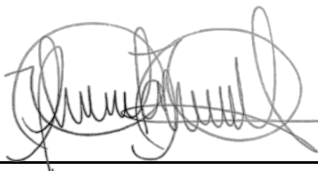
Tribunal Examinador:

(f) 

PhD. Krisztina Ríos

(f) 

PhD. Dalia Lau-Bonilla

(f) 

M.Sc. Christa Contreras

Fecha de aprobación: Guatemala, 3 de diciembre de 2025.

Prefacio

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por darme oportunidades tan grandes y bonitas en la vida, y por todas las bendiciones que he tenido la dicha de recibir, entre ellas el acceso al estudio y el amor de tantas personas.

Quiero agradecer enormemente a mi familia, porque han sido mi apoyo constante tanto a lo largo de este proyecto de graduación como en toda mi vida.

A las amistades que hice antes de mi trayecto universitario y que se han mantenido hasta el momento, porque aunque no siempre estemos juntos, han sido un pilar fundamental.

A mis catedráticos y directora de carrera, porque gracias a ellos hoy soy una profesional; su dedicación a la docencia y acompañamiento constante fueron los cimientos de la carrera que hoy en día culmino.

A mis asesoras de tesis, agradezco su confianza, paciencia, guía y determinación hacia mí y este trabajo, a pesar de las dificultades que surgieron durante el camino.

Finalmente, a las amistades que vinieron a mi vida durante estos cinco años, en cualquiera de las etapas, porque de ellos aprendí mucho, aunque el tiempo fuera poco. A ellos los llevaré en mi corazón sin importar lo que nos traiga la vida y los recordaré por todas las experiencias que compartimos. Son una familia para mí y me considero sumamente afortunada de haberlos conocido.

Prefacio	I
Índice de figuras	IV
Índice de cuadros	V
Resumen	VI
Abstract	VII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación	8
4. Objetivos	10
4.1. Objetivo general	10
4.2. Objetivos específicos	10
5. Hipótesis	11
5.1. Hipótesis nula	11
5.2. Hipótesis alternativa	11
6. Marco teórico	12
6.1. Lipasas bacterianas	12
6.2. Aplicaciones de las lipasas	18
6.3. Detección de cepas bacterianas productoras de lipasas	20
6.4. Estabilidad de los procesos metabólicos lipídicos	22
6.5. Ensayos de antagonismo bacteriano	23
7. Metodología	25
7.1. Diseño, enfoque y tipo de investigación	25
7.2. Población y muestra	25

7.3. Variables	26
7.4. Metodología	26
7.5. Preparación de extractos y perlas	30
8. Resultados	34
9. Discusión	47
10. Conclusiones	54
11. Recomendaciones	55
12. Referencias	56
13. Anexos	64
13.1. Anexo A. Caracterización de bacterias del suelo	64
13.2. Anexo B. Factor de conversión a UFC calculado por cepa	65
13.3. Anexo C. Selección de modelos para la representación de los datos de absor- bancia	66
13.4. Anexo D. Controles de las pruebas realizadas	67
13.5. Anexo E. Efecto de las variables en la absorbancia según los modelos selec- cionados	70
13.6. Anexo F. Validación de modelos seleccionados	71

Índice de figuras

1.	Cuantificación de la actividad enzimática en la degradación de lípidos . . .	4
2.	Efecto de la temperatura y la estabilidad en la lipasa BJ-10	4
3.	Efecto de la temperatura y el pH en la actividad y la estabilidad de la lipasa purificada de <i>P. aeruginosa</i> HFE733	5
4.	Ruta de degradación y uso de <i>n</i> -alcanos del aceite en <i>Archaeoglobus</i>	7
5.	Estructura tridimensional de una lipasa de <i>Bacillus subtilis</i> obtenida de la base de datos RCSB PDB.	13
6.	Características de las lipasas a nivel de reacción y estructura	14
7.	Clasificación de lipasas y esterases	14
8.	Árbol filogenético inferido para las lipasas y las esterases de las diecinueve subfamilias planteadas	17
9.	Construcción de una biblioteca de ADN genómico	21
10.	Viabilidad y crecimiento de las cepas y los consorcios en medio mínimo . .	36
11.	Curvas de crecimiento bacteriano en medio mínimo	37
12.	Espectros de FTIR de aceite sin degradar y muestras tratadas con consorcios	38
13.	Bacterias observadas en el suelo	39
14.	Absorbancia a 405 nm de las cepas bacterianas en el aceite del suelo no autoclaveado	40
15.	Absorbancia a 405 nm de las cepas bacterianas en el aceite del suelo autoclaveado	41
16.	Absorbancia a 405 nm de las cepas inmovilizadas en perlas	43
17.	Absorbancia a 405 nm de los consorcios bacterianos	44
18.	Efectos de la temperatura, el pH y la bacteria en la absorbancia	70
19.	Validación de residuales para el modelo lineal de la absorbancia en suelo no autoclaveado	71
20.	Validación de residuales para el modelo lineal de la absorbancia en suelo autoclaveado	72

Índice de cuadros

1.	Descripción de las variables experimentales	26
2.	Caracterización de las cepas bacterianas	34
3.	Antagonismo bacteriano en agar rojo de fenol	35
4.	Parámetros de regresión para los modelos seleccionados en suelos autoclaveados y no autoclaveados	42
5.	Estadística descriptiva de la absorbancia de las cepas en perlas	43
6.	Estadística descriptiva de la absorbancia de los consorcios	45
7.	Métodos metabolómicos para la caracterización de compuestos de degradación en suelo	46
8.	Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias en el suelo no autoclaveado	64
9.	Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias en el suelo autoclaveado	65
10.	Conteo de UFC en medio mínimo para las cepas bacterianas	65
11.	Comparación de modelos planteados para la absorbancia observada	66
12.	Controles de los valores de OD600 y UFC/mL para las cepas bacterianas bajo diferentes condiciones de pH y temperatura	67
13.	Controles de los valores de absorbancia para los consorcios bajo distintas condiciones de pH y temperatura	68
14.	Controles de los datos de absorbancia de las cepas individuales bajo distintas condiciones de pH y temperatura	69

La biorremediación ha surgido como una tecnología prometedora para el tratamiento de la contaminación de ambientes. Es particularmente efectiva al tratar con contaminación grasa en suelos, ya que las bacterias tienen un rol dominante. Por ende, es necesario comprender los procesos microbiológicos y bioquímicos que regulan el comportamiento de estas cepas en condiciones variables. A partir de esto, el objetivo del presente estudio se centró en detectar y caracterizar cepas bacterianas aisladas de suelo de caña de azúcar, productoras de lipasas extracelulares termoestables y pH-estables, con potencial de armar un consorcio para mejorar su capacidad de degradación de residuos grasos. Asimismo, se evaluó la estabilidad y actividad enzimática de los extractos bacterianos en diferentes modalidades, tanto libres como inmovilizados en perlas, evaluando las posibles interacciones competitivas. Se identificaron cuatro cepas bacterianas con presencia de lipasas extracelulares. Con base en pruebas espectrofotométricas con tres condiciones diferentes de pH y temperatura, se observaron diferencias en las absorbancias medidas. Estas pueden atribuirse a un cambio metabólico relacionado con la actividad de las lipasas, sin embargo está sujeto a verificación. En general, las pruebas realizadas en el suelo no autoclaveado presentaron valores más altos de absorbancia, lo cual sugiere una posible sinergia con las especies bacterianas nativas del suelo y un cambio en las propiedades fisicoquímicas del suelo. La inmovilización en perlas no pareció mejorar la estabilidad, por lo que se debe estandarizar el proceso específicamente para las condiciones experimentales y así obtener mejores resultados. Dentro de los consorcios evaluados y las cepas individuales, se identificó una capacidad de usar el aceite como sustrato, lo cual libera nutrientes para permitir el crecimiento de las bacterias y fortalece su potencial de aplicación en biorremediación. Debido a las limitaciones identificadas, se recomienda llevar a cabo análisis metabólico de las bacterias utilizadas para determinar los compuestos involucrados en los cambios metabólicos observados. Además, se sugiere realizar pruebas de presencia de biofilm con cristal violeta y evaluar el rendimiento de las cepas y consorcios en suelo contaminado industrialmente.

Palabras clave: lipasas extracelulares, biorremediación, residuos grasos, metabolismo, consorcios bacterianos.

Bioremediation has emerged as a promising technology for addressing environmental contamination. It is particularly effective in treating lipid-based pollution in soils, a technique in which bacteria play a dominant role. Therefore, it is essential to understand the microbiological and biochemical processes that regulate the behavior of these bacterial strains under variable conditions. Based on this, the aim of the present study was to detect and characterize bacterial strains isolated from sugarcane-associated soils that produce thermo- and pH-stable extracellular lipases, with the potential to form a consortium to enhance their capacity for fatty waste degradation. Additionally, this study aimed to evaluate the stability and enzymatic activity of bacterial extracts under different modalities, both free and immobilized in beads, while assessing possible competitive interactions. Four bacterial strains with extracellular lipases were identified. Based on spectrophotometric assays under three different pH and temperature conditions, variations in absorbance were observed, which may be attributed to metabolic changes related to lipase activity; however, this is subject to verification. Overall, assays conducted in non-autoclaved soil showed higher absorbance values, suggesting possible synergy with native soil microbiota and changes in physicochemical properties of soil. Immobilization in alginate beads did not appear to improve stability, indicating that this process should be standardized for the specific experimental conditions to achieve better results. Among the evaluated consortia and individual strains, the ability to use oil as a substrate was confirmed, releasing nutrients that support bacterial growth and reinforcing their potential for application in bioremediation. Given the identified limitations, it is recommended to perform metabolomic analyses of the selected strains to determine the compounds involved in the observed metabolic changes. Additionally, biofilm formation assays using crystal violet and performance evaluations in industrially contaminated soil should be conducted.

Keywords: extracellular lipases, bioremediation, fatty residues, metabolism, bacterial consortia.

La acumulación de residuos grasos provenientes de actividades industriales representa un problema ambiental significativo, en especial en sectores como el de procesamiento de caña de azúcar. Estos residuos, difíciles de degradar de forma natural, afectan la calidad del suelo y de los cuerpos de agua circundantes, generando así un impacto negativo tanto ecológico como económico (Chandra et al., 2020). Una de las estrategias propuestas para enfrentar esta problemática es el uso de microorganismos con capacidad lipolítica, dado que muchos de ellos pueden degradar lípidos complejos en productos más simples y menos contaminantes.

Dentro de las enzimas involucradas, aquellas de carácter bacteriano y lipolítico han captado especial interés debido a su alta especificidad de sustrato, su capacidad de activación interfacial y su resistencia a condiciones extremas como altas temperaturas y cambios de pH. Estas características las hacen adecuadas para aplicaciones industriales, donde la eficiencia en la degradación de residuos grasos debe mantenerse bajo condiciones exigentes (Rojo, 2019). Sin embargo, aunque varias especies bacterianas han sido estudiadas por su producción de enzimas lipolíticas, la termoestabilidad y pH-estabilidad siguen siendo criterios críticos que limitan su uso a gran escala (Hu et al., 2018; Madan y Mishra, 2014).

El presente estudio se desarrolló en el campo de la microbiología ambiental aplicada, con el objetivo de identificar cepas bacterianas aisladas de suelos asociados a cultivos de caña de azúcar que produjeran lipasas extracelulares con propiedades termoestables y pH-estables. Con base en ello, se buscó evaluar su potencial para integrarse en consorcios funcionales que mejoren la eficiencia de degradación de residuos grasos. Para ello, se realizaron pruebas espectrofotométricas de los extractos bacterianos bajo tres condiciones distintas de pH y temperatura, tanto en estado libre como inmovilizados en perlas, y se analizaron las interacciones competitivas entre cepas.

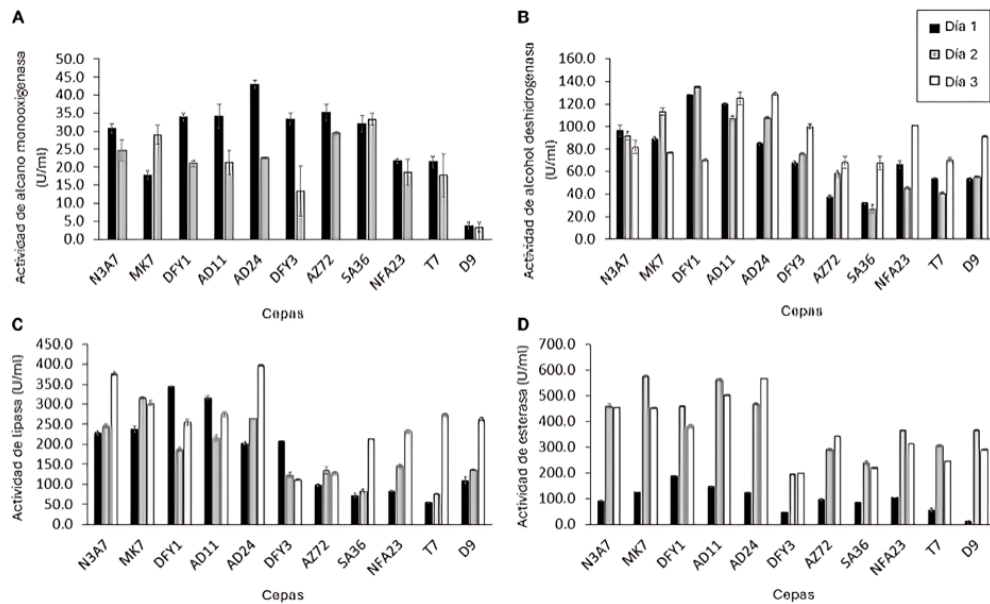
Se identificaron cuatro cepas con lipasas extracelulares y se observó que las pruebas realizadas en suelo no autoclaveado presentaron mayores valores de absorbancia. Esto sugiere una posible sinergia con las bacterias del suelo usado y un cambio en las propiedades fisicoquímicas del suelo. No se observó una mejora de la estabilidad con las perlas como se

esperaba, por lo que se necesita estandarizar este proceso. Ya que las bacterias evaluadas presentaron crecimiento usando el aceite como fuente directa de nutrientes, estas tienen potencial en el ámbito de biorremediación y, por ende, representan una base valiosa para futuras investigaciones en este campo.

Las lipasas son parte de un grupo enzimático con capacidad de degradación de sustratos lipídicos junto con las alcanos monooxigenasas, alcohol deshidrogenasas y esterasas. Sin embargo, se ha reportado que las lipasas tienen mejor capacidad de degradación debido a su activación interfacial y la presencia de una tapa móvil que le brinda más especificidad de sustratos. Un estudio realizado por Adlan y colegas en 2020 mostró que, dentro de las enzimas mencionadas, las lipasas presentaron una actividad más estable respecto al tiempo y un periodo de activación más corto usando residuos de cera como sustrato (Figura 1). Tomando en cuenta que la cera es una de las grasas con componentes más complejos, las lipasas son una buena opción para descomponer un amplio rango de desechos grasosos (Adlan et al., 2020)

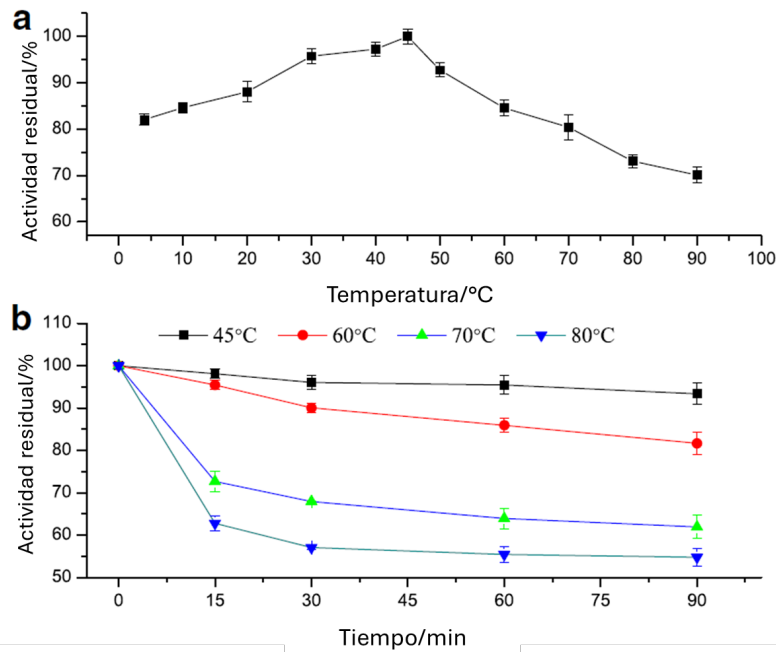
Tomando en cuenta que este estudio se realizó usando cepas bacterianas termófilas, el enfoque se coloca en aquellas lipasas de carácter termoestable. Sin embargo, también se debe tomar en cuenta la estabilidad al pH, debido a que esta variable forma parte de las condiciones extremas de los procesos industriales. Por ende, estudios se han dedicado a evaluar la actividad de las lipasas incluso bajo estrés proveniente de cambios en temperatura y pH. Zhang y su equipo realizaron dicha prueba en 2018 usando la lipasa BJ-10 de *Pseudomonas fluorescens*, para la cual ya se había reportado termoestabilidad. Esta se evaluó en su estado silvestre, es decir que no tenía ninguna modificación a su estructura ni a sus genes para mejorar su actividad. Se reportó la actividad residual de la lipasa en términos de su capacidad para seguir funcionando de forma eficaz después de haber sido expuesta a condiciones que podrían inactivarla o disminuir su rendimiento. Esta cambió muy poco a 45 °C a lo largo de un tiempo prolongado y conservó más del 92 % de su actividad residual, por lo que tiene alta estabilidad a esta temperatura. Por otro lado, retuvo aproximadamente el 81, 61 y 84 % de la actividad luego de noventa minutos a 60, 70 y 80 °C, respectivamente. Aunque la actividad fue menor, la lipasa conservó el 50 % de su estabilidad, por lo que no pierde su actividad catalítica por completo (Figura 2). Esto indica además que esta lipasa tiene una temperatura de funcionamiento óptima a 45 °C (W. Zhang et al., 2018)

Figura 1. Cuantificación de la actividad enzimática en la degradación de lípidos



Nota. Actividad enzimática de (A) alcano monooxigenasa, (B) alcohol deshidrogenasa, (C) lipasa y (D) esterasa durante la degradación de cera cruda por cepas bacterianas termófilas (Adlan et al., 2020).

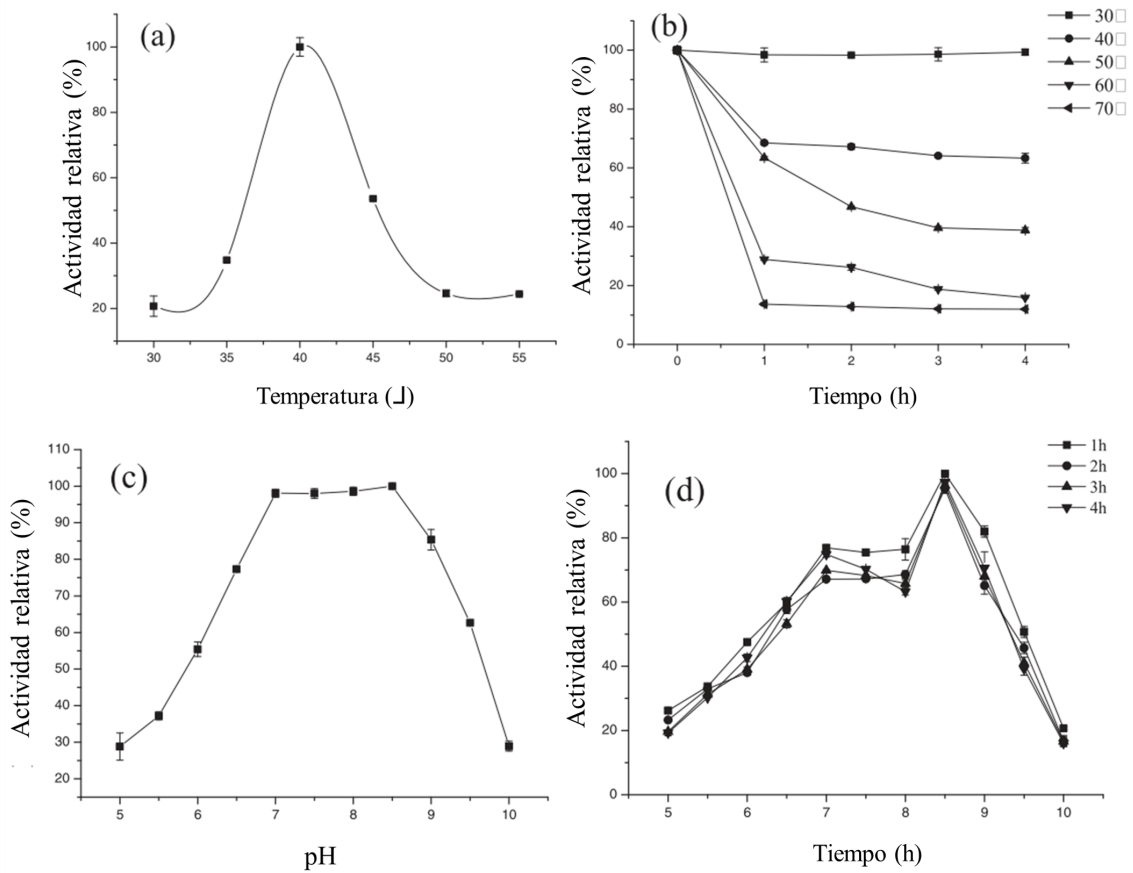
Figura 2. Efecto de la temperatura y la estabilidad en la lipasa BJ-10



Nota. Efecto de la temperatura en (a) la actividad y (b) la estabilidad de la lipasa BJ-10 (W. Zhang et al., 2018).

Otra especie de *Pseudomonas* ampliamente estudiada es *P. aeruginosa*, de la cual se conocen varias lipasas. En específico, la lipasa HFE733 es de carácter alcalino, es decir que es más activa en valores de pH básico (Figura 3). Al evaluar el efecto de la temperatura y el pH en su actividad y estabilidad, se observó que la actividad de la enzima es óptima a 45 °C, al igual que con la lipasa BJ-10, y disminuye a temperaturas más altas con el tiempo. Además, la actividad máxima y estabilidad ocurren en un rango de pH de 7 a 8. Cabe resaltar que el mayor porcentaje de actividad termoestable se mantuvo hasta por treinta horas, pero la pH-estabilidad solo se sostuvo hasta cuatro horas cuando estaba en el pH óptimo mencionado (Hu et al., 2018).

Figura 3. Efecto de la temperatura y el pH en la actividad y la estabilidad de la lipasa purificada de *P. aeruginosa* HFE733



Nota. Efecto de la temperatura en (a) la actividad y (b) la estabilidad y efecto del pH en la (c) la actividad y (d) estabilidad de la lipasa purificada de *P. aeruginosa* HFE733 (Hu et al., 2018).

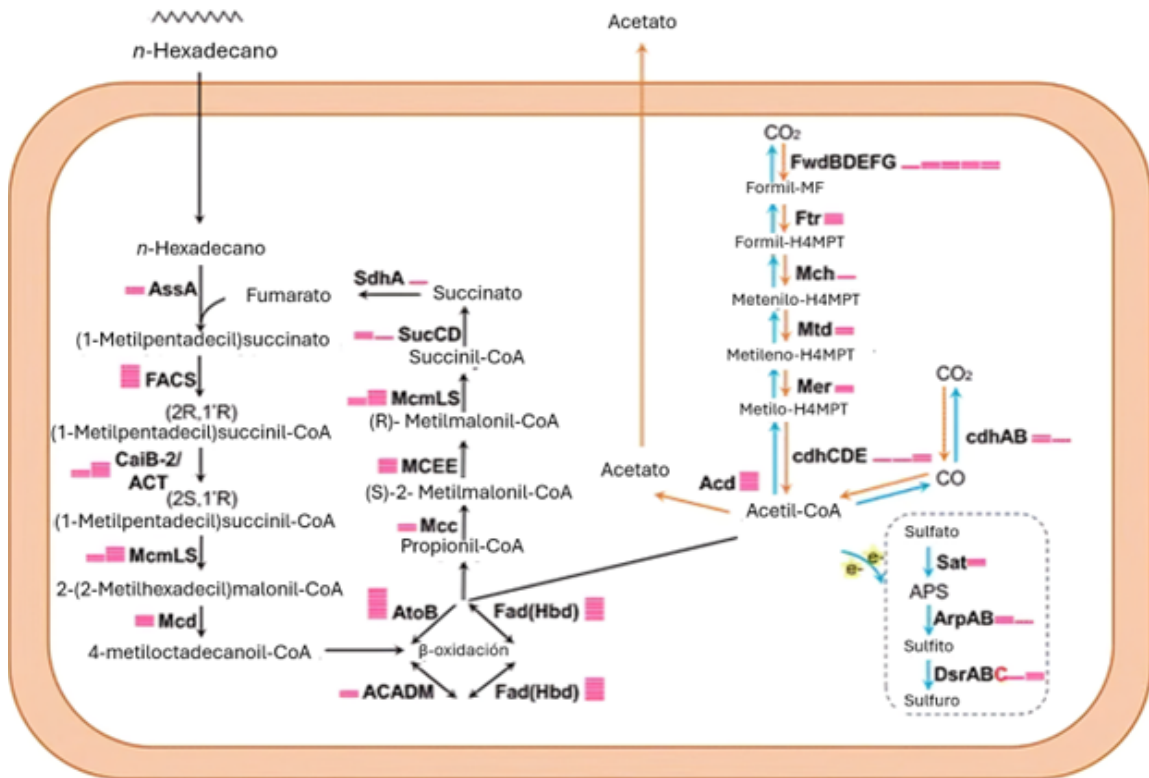
Tomando en cuenta el potencial sinérgico que pueden tener estas bacterias entre sí, se han realizado estudios enfocados en la construcción de consorcios bacterianos para la degradación de grasas en suelo contaminado. Uno de los más exitosos es el de Creencia y su equipo, quienes seleccionaron aislados de áreas de manglares y de aguas residuales de biodiésel cuyas actividades lipolíticas se habían evaluado cualitativa y cuantitativamente. Tomando los aislados con actividades más altas, se generó un consorcio que logró una

eficiencia de degradación de aceite residual de 94.84 %, considerablemente mayor que los porcentajes individuales. Bajo condiciones óptimas parcialmente optimizadas, se logró hasta el 96.99 % de degradación luego de siete a ocho días de incubación, demostrando la ventaja de utilizar cultivos mixtos en lugar de cultivos puros, ya que la cooperación entre las diferentes especies bacterianas puede aumentar la actividad lipolítica y la estabilidad del proceso de degradación (Creencia et al., 2014). Aunque en este caso se logró un largo periodo de actividad, la estabilidad bajo condiciones más similares a las industriales puede disminuirse. Se han hecho estudios para lograr extender la estabilidad durante horas, como en la experimentación de Hu y colegas, pero manteniendo también la pH-estabilidad y un alto porcentaje de actividad. Se deben complementar los estudios realizados para tener lipasas disponibles en el mercado que cumplan con estas necesidades.

Sabiendo que la termoestabilidad y la pH-estabilidad contribuyen a una mejor actividad de las lipasas, ciertas investigaciones se han centrado en determinar qué factores influyen en la estabilidad de las lipasas, sin que estas pierdan su función y desempeño. Un estudio realizado en 2002 por Tyndall y su equipo se enfocó en determinar los factores que contribuyen a la termoestabilidad de una lipasa de *Bacillus stearothermophilus* P1. En particular, se encontró que los iones de zinc juegan un papel importante en la estabilidad, aunque no están directamente involucrados en la catálisis ya que se encuentran lejos del área catalítica. Sin embargo, el sitio de unión de zinc en esta lipasa específica está formado por dos residuos de histidina y dos de ácido aspártico, que son comunes en algunas lipasas para las cuales aún no se tiene información estructural cristalográfica. Esta unión puede ayudar a mantener la estructura de la enzima en condiciones de alta temperatura, lo que es crucial para su funcionamiento en ambientes térmicamente exigentes (Tyndall et al., 2002).

Si bien este tipo de investigaciones se han centrado en identificar los factores estructurales que confieren estabilidad a las enzimas bacterianas, estudios más recientes han ampliado el enfoque hacia la comprensión de los procesos metabólicos integrados en comunidades microbianas. En este sentido, Liu et al., en el 2018 demostraron que la eficiencia degradativa de hidrocarburos en ambientes con grasas no depende únicamente de la estabilidad individual de las enzimas, sino de la interacción metabólica entre diferentes taxones (Figura 4) . Se observó que la especie bacteriana *Acinetobacter* oxida completamente alcanos en presencia de oxígeno, mientras que arqueas como *Archaeoglobus* y *Methanosaeta* tienen la capacidad de fermentar alcanos para generar acetato y consumirlo, respectivamente. Estos hallazgos evidencian que la degradación de hidrocarburos en ambientes complejos depende de redes metabólicas interconectadas entre microorganismos (Liu et al., 2018). Sin embargo, la mayoría de los microorganismos evaluados en esa investigación son extremófilos, por lo que sus condiciones de crecimiento y metabolismo no siempre reflejan el comportamiento de bacterias mesófilas en ambientes más comunes o aplicables a procesos industriales.

Figura 4. Ruta de degradación y uso de *n*-alcanos del aceite en *Archaeoglobus*



Nota. Adaptado de Liu et al. (2018).

Por ende, otros estudios han puesto su atención en especies más ampliamente caracterizadas como aquellas del género *Bacillus*. La investigación de Sáez-Navarrete y Cáceres-Zambrano (2025) demostró que son capaces de mantener una notable resistencia incluso en presencia de altos porcentajes de aceite, confirmando su capacidad de biotransformación mediante la producción de dióxido de carbono y la generación de emulsiones estables (Sáez-Navarrete & Cáceres-Zambrano, 2025). Esto consolida a dicho género bacteriano como un buen modelo para evaluar estrategias de biorremediación junto a otras bacterias.

En Guatemala, la generación de residuos grasos industriales representa un problema ambiental creciente. Según el Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales (MARN), se producen aproximadamente 2,916,350 toneladas anuales de desechos sólidos, de los cuales cerca del 8.5% corresponde a residuos de origen comercial e industrial, incluyendo ingenios azucareros, procesadoras de alimentos y plantas de aceites (Rodríguez, 2023)

Gran parte de estos desechos tiene como destino los vertederos, además de cuerpos de agua y suelo. Su acumulación no solo reduce la oxigenación, sino que también genera daños a la flora y fauna, mutaciones y enfermedades en plantas, disminución de la fertilidad del suelo, e impactos negativos en la cadena alimentaria (Abu-Khasan & Makarov, 2021). Además, estos residuos se acumulan durante un periodo de tiempo prolongado y pueden liberar compuestos tóxicos que agravan la contaminación (Mekkiyah et al., 2023).

Frente a esta problemática, el uso de lipasas microbianas ha surgido como una estrategia eficiente debido a su capacidad de hidrolizar triglicéridos y otros compuestos grasos, transformándolos en productos más simples y menos contaminantes (Chandra et al., 2020). Estudios previos han demostrado el potencial de las bacterias lipolíticas en la remediación de suelos contaminados, no solo por sí solas sino por medio de consorcios especializados para la degradación de residuos grasos. Las condiciones industriales bajo las cuales se manejan dichos residuos suelen incluir temperaturas extremas y variaciones de pH, las cuales se pueden trasladar al suelo y modificar las condiciones naturales del mismo. Por ende, las bacterias lipolíticas con estas propiedades son más deseables para la formación de los consorcios (J. Li et al., 2024). Para optimizar la selección de estas bacterias, el uso de pruebas de antagonismo se presenta como una herramienta accesible y sencilla, ya que permiten evaluar la compatibilidad entre bacterias para diseñar consorcios microbianos eficientes

En Guatemala, la investigación en biorremediación aún es una aplicación reciente, por lo que este tipo de estudios representa un avance importante hacia la implementación de tecnologías sostenibles para la gestión de residuos y el bienestar ambiental. Por ende, el presente estudio tiene como objetivo identificar cepas bacterianas extraídas de suelos asociados a cultivos de caña de azúcar que produzcan lipasas extracelulares con propiedades

termoestables y pH-estables bajo diferentes condiciones. En base a ello se evaluó el potencial de las cepas de integrarse en un consorcio bacteriano que aumentara su eficiencia de degradación de residuos grasos.

4.1. Objetivo general

Identificar cepas bacterianas extraídas de suelo de caña de azúcar productoras de lipasas extracelulares termoestables y pH-estables con potencial de armar un consorcio para mejorar su capacidad de degradación de residuos grasos.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar la presencia de lipasas extracelulares en un grupo de diferentes cepas bacterianas aisladas de suelo de caña de azúcar por medio de una prueba colorimétrica.
- Evaluar la termoestabilidad y pH-estabilidad de las enzimas lipolíticas bacterianas para identificar aquellas con mejor actividad y sin efectos de antagonismo usando pruebas espectrofotométricas y microbiológicas.
- Comparar la actividad de las enzimas lipolíticas bacterianas a nivel individual y en consorcios con el fin de identificar posibles efectos sinérgicos en la degradación de aceite.
- Identificar los métodos con potencial de análisis metabolómico que llevan a la determinación de efectos metabólicos de carácter bacteriano en suelo contaminado con aceite.

5.1. Hipótesis nula

Las bacterias productoras de lipasas termoestables y pH-estables con potencial actividad lipolítica, mantienen o incluso incrementan su actividad cuando forman parte de un consorcio bacteriano, en comparación con su desempeño en condiciones individuales.

5.2. Hipótesis alternativa

Las bacterias productoras de lipasas termoestables y pH-estables con potencial actividad lipolítica, disminuyen su actividad cuando forman parte de un consorcio bacteriano, en comparación con su desempeño en condiciones individuales.

6.1. Lipasas bacterianas

6.1.1. Definición y características de las lipasas

Las lipasas, también llamadas serina hidrolasas, son un grupo de enzimas pertenecientes a la familia de las hidrolasas de ésteres de triacilglicerol (Chandra et al., 2020). Por ende, pueden catalizar la hidrólisis de triglicéridos de cadena larga, es decir, aquellos que tienen entre doce y dieciocho carbonos (Lehninger et al., 1970), a ácidos grasos. Por lo general, estas enzimas tienen una estructura conformada por una secuencia de aminoácidos conservada, conocida como un pentapéptido debido a que contiene una glicina, una serina y un residuo ácido como glutamato o ácido aspártico intercalados por otro aminoácido cualquiera. Dicha región, conocida como la triada catalítica, es a la que se une el sustrato (Navarro-González & Periago, 2012). Dentro de la estructura también hay una región glicosilada, la cual es crucial para que la lipasa se considere completamente activa y pueda ser secretada en el caso de aquellas de carácter extracelular. Además, su forma tridimensional incluye ya sea láminas β o hélices α dispuestas en forma paralela y antiparalela, respectivamente (Ben-Zeev et al., 1994) (Figura 5).

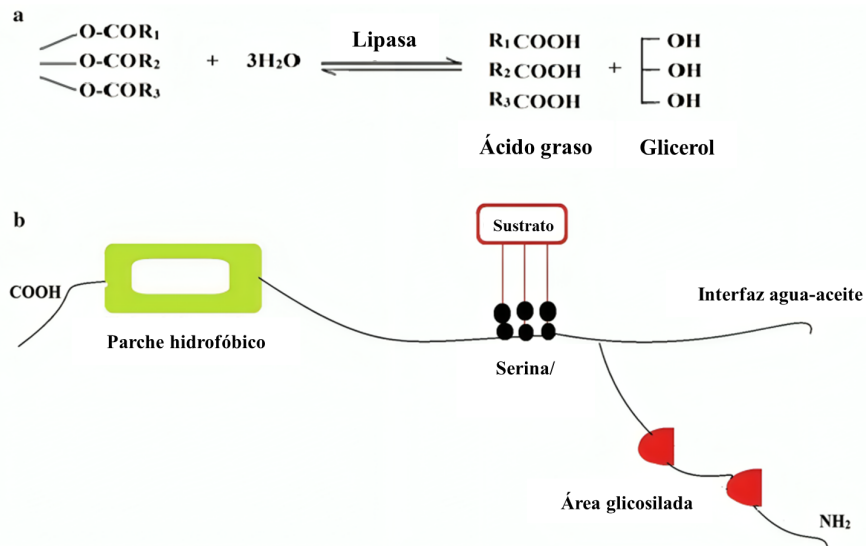
Figura 5. Estructura tridimensional de una lipasa de *Bacillus subtilis* obtenida de la base de datos RCSB PDB.



Nota. Dentro de la conformación terciaria de la lipasa, las estructuras de los aminoácidos pertenecientes al pentapéptido y la triada catalítica (serina, glicina, valina, lisina y leucina) se muestran en el área indicada con una flecha roja. Además, su estructura presenta hélices α junto a láminas β en disposición paralela, representadas por los listones y flechas verdes, respectivamente. Algunos residuos clave se muestran en forma de esferas, siendo rojo para oxígeno y azul para nitrógeno, además de moléculas de agua como esferas rojas aisladas (Kawasaki et al., 2002).

Las lipasas suelen operar en la interfaz entre lípidos y un medio acuoso, por lo que una de las características importantes de dichas enzimas es la presencia de una tapa móvil ubicada sobre el sitio activo (Figura 6). Si la tapa está cerrada, el sitio activo es inaccesible para los sustratos y la enzima se considera inactiva y sin actividad catalítica. Tomando esto en cuenta, las lipasas que se encuentran en un medio orgánico – acuoso presentan mayor actividad, conocida como activación interfacial (Kourist et al., 2017).

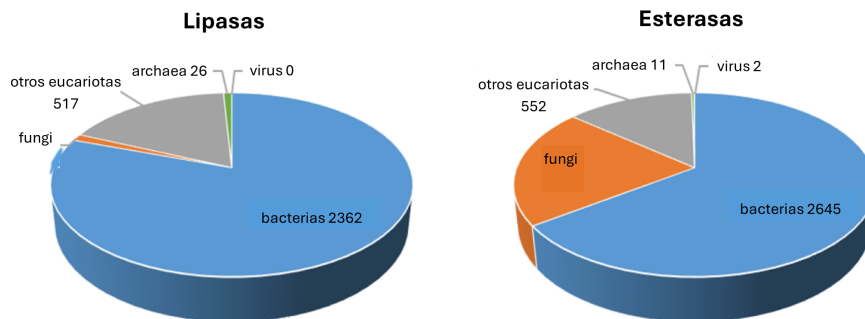
Figura 6. Características de las lipasas a nivel de reacción y estructura



Nota. (a) Hidrólisis de triglicéridos a glicerol y ácidos grasos. (b) Molécula de lipasa (Chandra et al., 2020).

Si bien las lipasas cumplen papeles importantes en la mayoría de los organismos vivos, las de carácter microbiano son preferidas para usos comerciales por sus características únicas en cuanto a resistencia a solventes, temperatura, pH, entre otros. Varias cepas bacterianas con lipasas se han encontrado en diferentes ambientes como agua de mar, fuentes hidrotermales, efluentes industriales, glaciares y permafrost, (Ali et al., 2023). Es por ello que las lipasas bacterianas predominan dentro de los dominios de la vida, representando más del 50 % de las 4,257 lipasas descritas en bases de datos (Rojo, 2019). Las lipasas presentan similitudes con otro grupo de enzimas, las esterasas, que también hidrolizan triglicéridos, pero de cadena corta, lo cual ha llevado a que se genere una clasificación conjunta de ambas enzimas (Figura 7).

Figura 7. Clasificación de lipasas y esterasas



Nota. Clasificación de lipasas y esterasas de la base de datos BRENDA en grupos taxonómicos de bacterias, arqueas, virus, hongos y otros eucariotas utilizando la base de datos UniProt (Rojo, 2019).

6.1.2. Clasificación de las lipasas bacteriana

En general hay una baja similitud entre y dentro de los grupos de enzimas lipolíticas en cuanto a las secuencias de aminoácidos que las conforman. Sin embargo, se han planteado diecinueve familias basadas en información filogenética, regiones conservadas en la secuencia y funciones biológicas. Las primeras ocho familias fueron propuestas por Arpigny y Jaeger en 1999 (Louis & Jaeger, 1999), pero en estas solo se incluían cincuenta y tres lipasas y esterases procariotas, por lo que en los últimos años se ha ampliado dicha clasificación (Figura 8).

Familia I o lipasas verdaderas

Son aquellas que primero se estudiaron y usaron a nivel industrial y son provenientes de *Pseudomonas*. Debido a que algunas especies de *Pseudomonas* fueron renombradas y al descubrimiento de nuevas lipasas, la familia I se subdividió en seis subfamilias. La subfamilia uno y dos tienen la peculiaridad de que requieren de la asistencia de proteínas llamadas chaperonas en el plegamiento y formación de puentes disulfuro.

Familia II o GDSL

La característica más relevante de esta familia es que su pentapéptido no está formado por los aminoácidos tradicionales, sino por una glicina, seguido de un ácido aspártico, una serina y una leucina, lo cual le da el nombre de GDSL a la familia.

Familia III

Presentan tanto la triada catalítica como la forma tridimensional característica de las α/β – hidrolasas. Además, se ha observado que presentan una similitud significativa con la acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas humanas (PAF-AH), lo cual indica que existen secuencias conservadas entre dominios y organismos.

Familia IV o sensibles a hormonas (LSH)

Incluye esterases de procariotas que incluyen bacterias termófilas, mesófilas y psicrófilas, es decir que pueden resistir temperaturas altas, moderadas y bajas, respectivamente (Rojo, 2019). Además del pentapéptido característico de las lipasas, las enzimas de esta familia también presentan una secuencia His-Gly-Gly-Gly (histidina y glicerina) localizada antes de la triada catalítica.

Familia V

También incluye enzimas de bacterias termófilas, mesófilas y psicrófilas, las cuales presentan una similitud con otras enzimas bacterianas no lipolíticas que varía entre un 20 % y 25 %. Todas poseen una triada catalítica conformada por serina, ácido glutámico o aspartato e histidina, además del plegamiento característico de las α/β – hidrolasas.

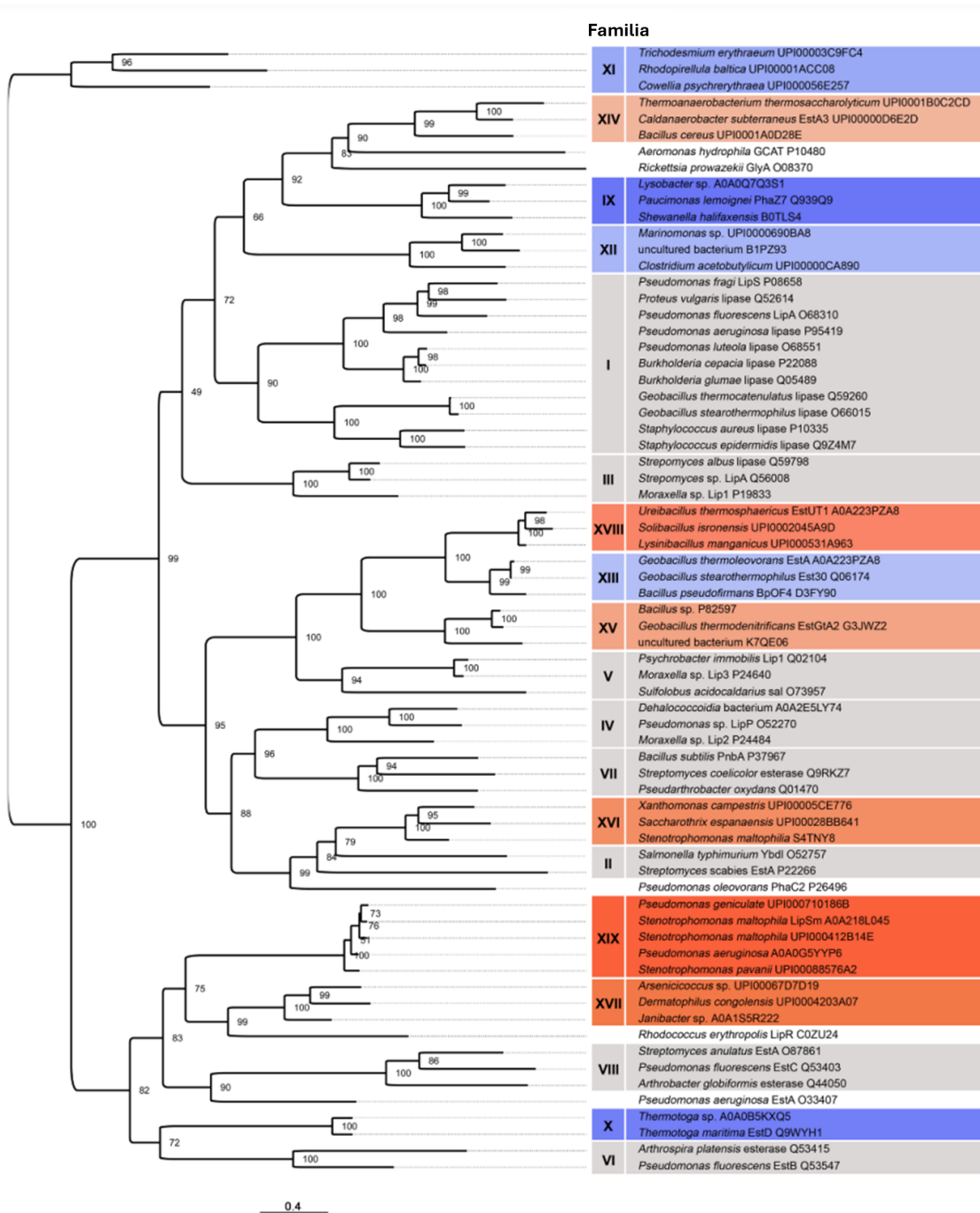
Familia VI

La enzima más caracterizada de esta familia es la carboxilesterasa de *Pseudomonas fluorescens*, la cual está formada por dos subunidades y la clásica triada catalítica. Tiene una preferencia de hidrólisis de sustratos pequeños con alta especificidad, pero no acepta triglicéridos como sustratos.

Familia VII - XIX

Dentro de estos grupos se encuentran enzimas que solamente se han encontrado en pocas especies bacterianas, por lo que son reducidas y específicas en cuanto a características y abundancia (Carranza et al., 2020).

Figura 8. Árbol filogenético inferido para las lipasas y las esterases de las diecinueve subfamilias planteadas



Nota. Adaptado de Rojo (2019).

6.2. Aplicaciones de las lipasas

6.2.1. Industria

Las lipasas microbianas, en especial las bacterianas, son más valiosas para aplicaciones industriales a comparación de aquellas derivadas de plantas o animales debido a su variedad de actividades catalíticas, alto rendimiento de producción y simplicidad de manipulación genética (Chandra et al., 2020).

Industria alimenticia

Una de las aplicaciones de las lipasas más exploradas en los últimos años es la industria de alimentos y bebidas. Estudios demuestran que los ingresos actuales de las enzimas en dicha industria representan alrededor del 55-60 % del mercado mundial de enzimas industriales, valorado en 5,500 millones de dólares (Guerrand, 2017). El trabajo realizado por Musa y colegas se centra en satisfacer la demanda de producción de sabores de forma alternativa a la tradicional, es decir de plantas o frutas, ya que representan un gasto muy elevado. Por medio de las lipasas, es posible producir sabores o aromas sintéticos a partir de una reacción de esterificación o transesterificación entre un ácido graso de cadena corta y alcohol. En la industria de lácteos, las lipasas juegan un rol importante en la hidrólisis de la grasa láctea, lo cual mejora el sabor y la textura del queso y acelera su maduración (Chandra et al., 2020). Las lipasas también se han utilizado como biosensores para la determinación cuantitativa de triglicéridos en los alimentos, lo cual no solo sirve como control de calidad sino también como registro de valor nutricional (Pohanka, 2019).

Industria farmacéutica y cosmética

Las lipasas son el grupo de enzimas más usado en la industria farmacéutica debido a que tienen una alta eficiencia en la síntesis de compuestos orgánicos, principalmente medicamentos enantiopuros. Estos últimos son aquellos que contienen solamente la forma molecular beneficiosa y por ende representan un tratamiento más seguro, lo cual está siendo explotado sobre todo en la manufactura de medicinas contra la depresión, la hipertensión y para la vasodilatación (Sikora et al., 2014).

La industria de la cosmética requiere del desarrollo acelerado de productos debido a la creciente demanda de los mismos en los últimos años. De forma similar a las moléculas aromáticas sintetizadas en la industria alimenticia, se han usado lipasas fúngicas como catalizadores en la producción de compuestos aromáticos para cremas y aceites corporales (Knezevic et al., 2006).

Producción y degradación de biopolímeros

Los biopolímeros son macromoléculas simples que vienen de organismos vivos y por ende son completamente biodegradables. Ejemplos comunes incluyen carbohidratos, proteínas,

ADN, ARN, lípidos y ácidos nucleicos (Baranwal et al., 2022). Tanto la síntesis como la hidrólisis de biopolímeros contribuye a un equilibrio en los sistemas biológicos ya que previene la acumulación de compuestos no necesarios y asegura un aprovechamiento eficiente de los recursos disponibles. Comparado con los procesos netamente químicos, los enzimáticos permiten un control preciso sobre la estructura del polímero de interés y el proceso puede realizarse bajo condiciones menos extremas. Además, con esto se evita la presencia de restos de catalizadores químicos en los productos (Kanmani et al., 2015).

Producción de biodiésel

Debido a la creciente incidencia de problemas relacionados con la contaminación ambiental, como cambio climático y gases de efecto invernadero, se ha aumentado la investigación en torno al mejoramiento de la tecnología del biodiésel. Por ende, se ha aprovechado la actividad catalítica de las lipasas para aprovechar la alta cantidad de desechos grasos de una forma sostenible y que no daña al ambiente. Tanto hongos como bacterias han demostrado ser fuentes adecuadas de lipasas, pero las bacterianas son las preferidas debido a que son más fáciles de producir a escala industrial (Chandra et al., 2020). Se ha observado que aquellas lipasas que tienen mayor actividad a bajas temperaturas son preferidas para la producción de biodiésel ya que generan una mayor tasa de rendimiento y de ahorro de energía (Hasan et al., 2006).

6.2.2. Biorremediación

El proceso de usar microorganismos para descomponer contaminantes presentes en el medio ambiente se conoce como biorremediación, lo cual ha ganado interés como alternativa para los métodos tradicionales que a menudo implican el uso de productos químicos. Algunos contaminantes comunes incluyen derrames de petróleo, suelos y aguas mezclados con grasas y desechos industriales, por lo que es un área de mucho potencial para las lipasas microbianas (Chandra et al., 2020). Las lipasas bacterianas son las preferidas para la biorremediación debido a su mayor disponibilidad, facilidad de producción y mayor actividad enzimática en comparación con las de hongos o levaduras. Especies bacterianas como *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus* son algunos de los principales microorganismos productores de lipasas que degradan los contaminantes efectivamente (Phulpoto et al., 2020).

6.2.3. Consorcios bacterianos

El uso de consorcios o grupos bacterianos ha demostrado ser más ventajoso para la degradación de compuestos complejos que el uso de bacterias aisladas. Esto se debe a que dentro de una agrupación las bacterias son más estables y adaptables a su ambiente, además de que se genera un entorno catalítico adecuado para cada enzima requerida en la ruta de degradación. También se distribuye la carga enzimática en diferentes cepas ya que algunas de ellas pueden comenzar a degradar los compuestos complejos para generar moléculas más pequeñas que sirven como fuente de carbono para otras cepas (Wang et al., 2019).

A comparación de un consorcio natural, uno de carácter artificial presenta la ventaja de tener una composición más simple, además de una división de tareas más clara entre cepas y el potencial de modificaciones posteriores para adaptarlo a diferentes productos de interés. Se han identificado dos principios para el diseño de consorcios microbianos artificiales: el enfoque de arriba hacia abajo y el de abajo hacia arriba. El primero utiliza variables ambientales cuidadosamente elegidas que obligan a un microbioma existente, ya sea natural o inoculado, a realizar los procesos biológicos deseados. Para ello es necesario conceptualizar el consorcio como un sistema donde se deben identificar claramente las entradas y salidas, tales como condiciones fisicoquímicas y variables ambientales, y como cada aspecto afecta el proceso de interés (Lawson et al., 2019). Si bien este enfoque ha sido exitoso en casos de tratamiento de aguas residuales y biorremediación, suele ignorar los procesos que dependen de las interacciones complejas entre microorganismos. Es por ello que los avances recientes se han centrado en el método de abajo hacia arriba, en el cual se modifica la red metabólica y las interacciones del microbioma. Esto se logra al obtener los genomas de cada miembro del microbioma y luego reconstruir las redes, permitiendo el diseño de microbiomas con propiedades específicas y una organización espaciotemporal que optimiza su funcionalidad (Cao et al., 2022).

En el caso de consorcios destinados a la degradación de compuestos complejos, se deben seleccionar cepas que cumplan con ciertas características. Estas deben tener una tasa baja de mutación, no deben generar subproductos tóxicos y deben tener alta tolerancia a condiciones amplias de pH, temperatura y presión osmótica, dada su aplicación en residuos industriales (H. Lu et al., 2019). Se ha demostrado que los microorganismos que se encuentran en áreas contaminadas con aceites se adaptan al ambiente, lo cual resulta en el surgimiento de mutaciones genéticas en futuras generaciones que les permiten degradar compuestos lipídicos complejos con más facilidad (Cao et al., 2022).

6.3. Detección de cepas bacterianas productoras de lipasas

6.3.1. Métodos de detección y selección de cepas

Métodos microbiológicos

Se han desarrollado y utilizado varios métodos para la detección de la presencia de lipasas, ya sea de forma cruda o purificada a partir de microorganismos. La tasa de reacción enzimática puede ser medida al determinar varios parámetros, ya sea la tasa de consumo del sustrato, la tasa de producción de ácidos grasos o la tasa de clarificación de la emulsión (Hasan et al., 2009).

Una de las formas más fáciles de determinar la lipólisis es por medio de cambios visuales en medios de cultivo. Estos representan un medio mínimo ya que se componen más que todo de sales pero están suplementados con un sustrato lipídico como única fuente de carbono. De esta manera, se atribuye el cambio observado en el medio a la actividad hidrolítica de las lipasas. El cambio puede darse por medio de la formación de un halo transparente alrededor de las colonias bacterianas o por medio de un cambio de color (Lee et al., 2015). Dicho cambio se debe a la disminución del pH en el medio como resultado de la liberación

de ácidos grasos. Uno de los ejemplos más comunes de este tipo de medios es el que contiene rojo de fenol, donde se da un cambio de color en el medio a amarillo por la acidificación generada (Ramnath et al., 2017). Esta técnica es conveniente para una identificación rápida de microorganismos lipolíticos, pero la acidificación del medio puede surgir como resultado de otros subproductos del metabolismo de lípidos aparte de los ácidos grasos, por lo que puede dar falsos resultados así que es recomendable acompañarla de más pruebas (Abdou, 2003). También se pueden usar tintes fluorescentes como rodamina B en ensayos en placa junto con aceite emulsificado como sustrato. La hidrólisis de este último causa un halo color naranja que es fluorescente al ser irradiado con luz UV (Hasan et al., 2009). Una alternativa al uso de estos tintes es el agar Spirit Blue disponible comercialmente, el cual genera una aglutinación junto con un halo color lavanda alrededor del inóculo bacteriano, siendo un resultado más preciso (Pham et al., 2021).

Métodos moleculares e inmunológicos

La creciente demanda por el uso de biocatalizadores más sostenibles y eficientes, como las lipasas, ha llevado al estudio de los microorganismos lipolíticos a un nivel molecular, ya que las técnicas de esta área son más avanzadas y precisas. Además, proporcionan información sobre la estructura genética y la funcionalidad de las lipasas, lo que permite una mejor comprensión de sus posibles aplicaciones.

La selección de microorganismos productores de lipasas puede darse por medio de análisis de secuencias. En este método, se recolecta ADN de las muestras y se generan fragmentos, los cuales pueden secuenciarse para determinar el orden exacto de sus bases y así observar sus características genéticas. Como alternativa, es posible insertar los fragmentos de ADN en un organismo diferente, llamado huésped, que puede ser otra bacteria. Cada fragmento de ADN se coloca en una bacteria diferente, creando una biblioteca de fragmentos (Figura 9). Esta biblioteca permite secuenciar todos los fragmentos a la vez, lo que facilita la identificación y el análisis de genes específicos que podrían codificar enzimas funcionales (Majumder et al., 2024).

Figura 9. Construcción de una biblioteca de ADN genómico



Nota. Adaptado de Seidman (2010).

Los métodos inmunológicos son usados para cuantificar la presencia de lipasas independientemente de su actividad lipolítica. Un estudio realizado por Beisson y su equipo en el año 2000 destaca el método de *immunoblotting*, que consiste en combinar electroforesis en gel con una forma inmunoquímica de detección. Este es usado para determinar tanto la masa molecular de las lipasas como la especificidad de anticuerpos para una determinada

lipasa. Las enzimas son separadas en un gel de poliacrilamida con SDS (sodio dodecil sulfato) y luego son lavadas e incubadas con anticuerpos en presencia de agentes de bloqueo que reducen la unión no específica a las lipasas (Beisson et al., 2000).

6.3.2. Evaluación de procesos metabólicos asociados a la hidrólisis de lípidos

De forma similar a los métodos en agar sólido, la capacidad de los microorganismos para utilizar lípidos puede evaluarse a través de la liberación de ácidos grasos. Dentro de los métodos más accesibles y convenientes se incluye la titulación de los ácidos grasos liberados como resultado de la lipólisis, ya que es detectable por medio de un cambio de color. Se usa fenolftaleína como indicador para determinar el volumen de NaOH necesario para neutralizar los ácidos, con lo cual se establece una relación directa entre la cantidad de NaOH usada y la actividad de las lipasas (Hu et al., 2018). Otro método colorimétrico involucra el uso de rojo de fenol, lo cual se hace de forma similar al ensayo en medio sólido en el sentido de que se observa un cambio de color por la disminución de pH (Hasan et al., 2009).

El uso de la espectrofotometría complementa estas técnicas al registrar la acumulación de compuestos intermedios en diferentes longitudes de onda, lo que refleja la degradación lipídica y la presencias de productos resultantes de la actividad metabólica (Hussain, 2023).

Una manera de optimizar los métodos anteriores es optar por inmovilizar los extractos de bacterias o sus enzimas asociadas, ya que estas son inestables por sí mismas y aún más si se les expone a variaciones de pH y temperatura fuera de las células bacterianas. La inmovilización de enzimas previene esto al restringir físicamente a las enzimas sin quitarles su capacidad de catálisis. Al mismo tiempo se aumenta su pureza ya que pueden ser extraídas fácilmente del medio cuando están adheridas a un soporte sólido. La elección de dicho soporte depende de muchos aspectos, como el tamaño de poro, el área superficial y la resistencia mecánica, con lo cual se asegura que las enzimas puedan entrar por los poros, que se aumente la eficiencia de inmovilización y que el soporte sea durable, respectivamente (Bilal et al., 2019). Los materiales usados como soporte pueden ser de origen natural, sintético o inorgánico según sus propiedades. El primer grupo presenta más variedad y es el más usado, sobre todo el alginato, un extracto de la pared celular de algas marrones, el cual puede usarse en gel o en perlas para la inmovilización enzimática (Hussain, 2023).

6.4. Estabilidad de los procesos metabólicos lipídicos

Las aplicaciones biotecnológicas e industriales asociadas a lipasas demandan cada vez más que estas sean estables ante diferentes factores, principalmente temperatura y pH. Por ende, muchos estudios se han enfocado en comprender las bases de la estabilidad de las enzimas tomando en cuenta varios aspectos (Ahmad et al., 2008).

6.4.1. Factores que afectan la estabilidad

Uno de los determinantes en la estabilidad de las proteínas son sus interacciones electrostáticas intramoleculares, como puentes de hidrógeno, pares iónicos, puentes salinos y el efecto hidrofóbico inherente de las lipasas. Sin embargo, la carga superficial se ha reconocido como otro factor importante que puede alterar la estabilidad. Esto se da por los residuos de aminoácidos que se encuentran en la superficie de las enzimas. Cada aminoácido tiene propiedades diferentes y en conjunto son responsables del plegamiento, función, solubilidad y estabilidad de las enzimas.

Alrededor de un tercio de los aminoácidos en la interfaz proteína-agua son residuos cargados, los cuales contribuyen a la estabilidad de la enzima a través de interacciones electrostáticas. La arginina y la lisina son los aminoácidos más comunes expuestos en la superficie de las lipasas, los cuales tienen una carga positiva bajo condiciones fisiológicas y forman enlaces iónicos, tales como puentes de hidrógeno, dentro de la enzima (Sokalingam et al., 2012).

La estabilidad de las enzimas lipolíticas también se ve afectada por la composición de su estructura secundaria, caracterizada por la presencia de α – hélices y hojas plegadas – β . Estas interacciones son estabilizadas por puentes de hidrógeno que mantienen el plegamiento correcto de la enzima. Además, las interacciones pueden contribuir a la formación de un núcleo hidrofóbico que protege la enzima de la desnaturalización en condiciones adversas. Las propiedades de estabilidad de estas enzimas dependen de la proporción de cada una de las estructuras mencionadas, lo cual varía entre especies bacterianas (Sahoo et al., 2019).

6.4.2. Importancia de la estabilidad lipolítica frente a temperatura y pH

Varios estudios se han enfocado en analizar la actividad de enzimas bacterianas lipolíticas bajo diferentes condiciones, especialmente temperatura y pH, con respecto al tiempo. Con esto se ha determinado cuanto tiempo permanecen estables y funcionales para evaluar su potencial de aplicación industrial. Ya que los procesos industriales se realizan en su mayoría bajo ambientes considerados extremos, es necesario emplear enzimas que no sufran desnaturalización o reducción de su actividad ya que se reduce la necesidad de añadir más enzima constantemente y por ende reduce costos y mejora la eficiencia. Además, las enzimas termoestables y pH-estables producen residuos menos dañinos debido a su especificidad de sustrato, lo cual promueve procesos amigables con el medio ambiente (Lajis, 2018).

6.5. Ensayos de antagonismo bacteriano

Los estudios de antagonismo bacteriano son fundamentales para comprender las interacciones competitivas o cooperativas entre cepas. Mediante técnicas como el cultivo en placa confrontada, difusión en agar o ensayos de sobreposición, se puede identificar la capacidad de una cepa para inhibir o tolerar el crecimiento de otra, ya sea a través de la producción de compuestos antimicrobianos, competencia por nutrientes o señalización química (Anith et al., 2021).

Estos ensayos no solo revelan el potencial inhibitorio de ciertas bacterias, sino también la compatibilidad entre miembros potenciales del consorcio, lo cual es esencial para garantizar la estabilidad y eficacia del sistema funcional propuesto. Una interacción sinérgica entre cepas puede traducirse en una mayor capacidad degradativa, bioestimulante o protectora, dependiendo del objetivo del consorcio. La evaluación sistemática de interacciones antes de ensamblar el consorcio permite predecir posibles interrupciones por antagonismo competitivo, facilitando una selección racional basada en la complementariedad metabólica y la tolerancia mutua (Sun et al., 2022). Este enfoque es relevante en consorcios diseñados para aplicaciones ambientales, como la biorremediación o el control biológico, donde la robustez funcional depende de la interacción positiva entre sus miembros.

7.1. Diseño, enfoque y tipo de investigación

El diseño de la presente investigación es de carácter cuasi experimental cuantitativo ya que no se tenía una aleatorización de las cepas a usar, además de que no se controlaron completamente todos los factores externos que puedan llegar a influir. Se manipularon variables independientes como la construcción de consorcios y variaciones de temperatura y pH para observar la capacidad de estos para degradar residuos grasos en suelos contaminados. Esto complementado con un análisis de las características de las cepas bacterianas trabajadas para determinar las que tuvieran más potencial de biorremediación.

7.2. Población y muestra

Las muestras bacterianas del suelo de cultivo de caña de azúcar fueron recolectadas y aisladas por la tesista Valeria Ochoa e Isabella García, con el proceso detallado en el trabajo “Análisis del microbioma bacteriano de suelos utilizados para el cultivo de caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, en Guatemala mediante metagenómica del gen 16S ARN ribosomal y caracterización de las bacterias promotores del crecimiento que se encuentran en ellos”.

En la presente investigación los sujetos de estudio son las bacterias aisladas y seleccionadas según el criterio de que sí presentaban lipasas extracelulares. Todas las cepas usadas se manejaron bajo los protocolos de bioseguridad pertinentes para evitar cualquier riesgo de contaminación cruzada, daño al personal o liberación accidental al ambiente, garantizando así el cumplimiento de las normativas institucionales.

7.3. Variables

Cuadro 1. Descripción de las variables experimentales

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medida
Especie bacteriana	Cepas que presentan lipasas extracelulares	Cualitativa	–
Presencia de lipasas	Cambio de color por pH en rojo de fenol	Cualitativa	Sí/No
Absorbancia	Producto liberado a diferentes condiciones de temperatura y pH	Cuantitativa	µmol/min
Temperatura	Temperatura a la que se exponen las bacterias	Cuantitativa	°C
pH	pH al que se exponen las bacterias	Cuantitativa	–
Antagonismo bacteriano	Inhibición del crecimiento de una bacteria	Cualitativa	Sí/No
Degradación de residuos grasos	Evidencia de descomposición de residuos grasos	Cualitativa	Sí/No
Esterilidad de la tierra	Tierra autoclaveada o no	Cualitativa	Sí/No
Tiempo de contaminación	Contaminación de tierra con aceite usado	Cuantitativa	Meses

Nota. Elaboración propia

7.4. Metodología

7.4.1. Reactivación y preparación de cepas bacterianas

Tomando en cuenta que las cepas bacterianas a usar se encontraban en criotubos, se buscó reactivarlas para que estas fueran viables para su posterior uso. Se mezclaron 2.7 mL de agar nutritivo en 90 mL de agua destilada en un erlenmeyer de 250 mL. Se calentó en estufa hasta ebullición y se agregaron 10 mL de leche entera líquida. Se repitió el mismo proceso con 10 mL de leche deslactosada líquida y luego con 10 mL de leche descremada líquida. Todos los erlenmeyers se colocaron en autoclave a 121 °C y 1 atm durante 20 minutos. Luego de dejar enfriar por aproximadamente 10 minutos, se plaqueó cada agar en cajas Petri trabajando en campana de flujo laminar esterilizada con etanol 70 %. Una vez el agar se hubo endurecido, se guardaron las cajas Petri a 4 °C hasta su uso. Además,

se preparó caldo nutritivo mezclando 1.5 g de caldo en 140 mL de agua destilada en un erlenmeyer de 250 mL. Se llevó a ebullición en estufa y se guardó a 4 °C hasta su uso. Se dividió el volumen total en 3 erlenmeyers de 100 mL, a los cuales se les agregó un 10% de leche en polvo entera, deslactosada y descremada, según correspondiera. Se mezcló hasta homogenizar y se colocaron en autoclave a 121 °C y 1 atm por 30 minutos (Cody et al., 2008).

Dentro de un cepario de bacterias, se buscaron aquellas cepas ya identificadas con presencia de lipasas extracelulares: *Bacillus paramycoides* 1AP1, *Pseudomonas putida* 1AP11, *Bacillus cereus* 1AP18, *Bacillus thuringiensis* 1AP20, *Bacillus subtilis* 1BP6, *Aeromonas cavie* 4BP6, *Aeromonas hydrophila* 2AB1, *Bacillus megaterium* 2AB4, *Aeromonas hydrophila* 2AB8, *Pseudomonas chlororaphis* 2AB9, *Pseudomonas chlororaphis* 2AB11, *Acinetobacter baumannii* 2AB15, *Exiguobacterium acetylicum* y 5MO7 *Chromobacterium rhizoryzea* 2BP1. De forma paralela, también se trabajó con bacterias de otro cepario: *Pseudomonas paraglycinae* 2MO6, *Pseudomonas sp.* 1AP23, *Pseudomonas canadensis* 2AP13 y *Pseudomonas paraglycinae* 2MO7 y *Pseudomonas canadensis* 2AP16. Trabajando en campana de flujo laminar esterilizada con etanol 70%, se mezcló 100 µL de cada cepa en 1 mL de caldo nutritivo de cada tipo de leche en tubos eppendorf. Estos se incubaron a 37 °C y 150 rpm por 24 horas. Pasado este tiempo, se inoculó todo el volumen de cada tubo eppendorf en 5 mL de caldo nutritivo de cada tipo de leche en tubos Falcon de 15 mL. Estos se incubaron a las mismas condiciones por 24 horas y luego se inocularon 100 µL de la suspensión en placas de agar nutritivo y se usó un esparcidor estéril para colocarlo en toda la placa. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se hicieron frotos en portaobjetos de las colonias observadas para cada cepa y, luego de fijarlos en mechero, se les hizo tinción de Gram. Para ello, se le echó cristal violeta por 1 minuto, lugol por 1 minuto, alcohol acetona por 3 segundos y safranina por 1 minuto. Se enjuagó el portaobjetos entre cada paso con agua estéril usando una pizeta. Se observaron las tinciones bajo microscopio usando aceite de inmersión y el objetivo 100X y se registró la morfología observada tanto a nivel microscópico como macroscópico (Cody et al., 2008).

Se hizo una revisión literaria respecto a las características morfológicas de cada cepa usada para asegurarse que se tratara de las bacterias de interés. Aquellas que presentaron la morfología adecuada se guardaron para realizar un aislado posterior por medio de estriado en placa con agar nutritivo. Las que no presentaron la morfología deseada se sometieron de nuevo al mismo proceso detallado antes para asegurarse de que no se tratara de una contaminación adquirida durante el proceso y una vez tuvieron el resultado deseado, se aislaron de igual manera. Las que no presentaron la morfología tras varios intentos se descartaron, al igual que aquellas que ni siquiera presentaron crecimiento inicial.

7.4.2. Identificación de potenciales *Pseudomonas* para los consorcios

De la misma manera descrita, se seleccionaron inicialmente solo aquellas cepas de *Pseudomonas* que presentaron crecimiento en el agar. Para verificar que sí se tratara de *Pseudomonas*, se preparó agar MacConkey, el cual sirve para identificar bacterias Gram negativas en base a su capacidad de crecer aún en presencia de ciertos inhibidores. En el mismo, se cultivaron las bacterias y se dejaron incubando a 37 °C por 24 horas. Aquellas que sí presentaron crecimiento se usaron para hacer frotis y, posteriormente, tinción de Gram para

observar su morfología. Se seleccionaron solo las cepas que sí tenían la morfología esperada según la literatura.

7.4.3. Identificación de presencia de lipasas extracelulares

Con el objetivo de identificar aquellas cepas bacterianas reactivadas que tuvieran lipasas extracelulares, se hizo una prueba con agar rojo de fenol. Para ello, se prepararon 450 mL de agar nutritivo y se colocó en autoclave por 15 minutos a 121 °C y 1 atm. Luego de dejarlo enfriar a una temperatura aproximada de 60 °C, se agregaron 4.5 mL de aceite de oliva y 4.5 mL de rojo de fenol 1 mg/mL para luego plaquearlo en cajas Petri trabajando en campana de flujo laminar estéril. Usando un asa en argolla, se tomó una asada de las bacterias aisladas, incluyendo las *Pseudomonas*, y se inocularon las placas justo en el centro. Se dejaron incubar a 37 °C por 48 horas. Pasado este tiempo, se observó el cambio de color rosado a amarillo, lo cual es un indicador de actividad de lipasas. (Pham et al., 2021). De aquí en adelante se usaron solo las bacterias que presentaron tanto lipasas como la morfología esperada. Cabe resaltar que, si bien las *Pseudomonas* no habían sido reportadas como productoras de lipasas extracelulares, se buscaba corroborar esto para asegurar que no influyeran en la actividad lipolítica de las demás bacterias.

7.4.4. Tipificación de tierra utilizada

Para conocer las características del tipo de tierra con el que se estaba trabajando, se hicieron ciertas pruebas con el mismo. En primer lugar, se examinó el físico del suelo, tomando en cuenta si era de un color oscuro o claro y si tenía piedras o plantas. Luego se recolectaron 50 g de suelo y se colocaron en un frasco, cuyo volumen se completó con agua, y se agitó por 2 minutos. Se dejó el frasco reposar sin tocarlo hasta que el suelo se asentara. En base a esto se observó la composición del suelo, ya que pueden hacerse capas de diferente tipo de materia, a las cuales se les asignó un porcentaje dependiendo de la cantidad de cada capa. Con ello se llegó a una conclusión sobre el tipo de suelo en base a parámetros ya establecidos por la NOAA. También se tomó un puñado de suelo húmedo y se presionó en una mano. Al abrir la mano se observó si la tierra mantenía su forma y si respondía a leves toques o no. Por último, se colocaron 25 g de suelo parcialmente seco en un contenedor limpio, al cual se le colocó un pequeño chorro de vinagre y se hizo lo mismo con otros 25 g pero se les agregó bicarbonato de sodio. En base a los resultados conjuntos de las pruebas, se determinó que el suelo con el que se estaba trabajando era de carácter limoso y con pH neutro (National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), s.f.).

7.4.5. Contaminación de suelo

Suelo no autoclaveado

Se usaron 4 contenedores de plástico estériles, en cada uno de los cuales se colocó 1 lb de suelo, separándolos en grupos experimentales. A cada uno se le colocó 3 mL de aceite usado para tener un nivel de contaminación alta. Se mezcló para homogenizarlo y se colocaron

los contenedores en un lugar fresco. Se les roció agua 2 veces por semana para evitar que se secase el suelo y se dejaron reposar los contenedores durante 3 meses a temperatura ambiente para eliminar potenciales compuestos volátiles.

Suelo autoclaveado

Se hizo lo mismo pero con suelo estéril, para lo cual se colocó tierra húmeda en 4 frascos, uno para control negativo y el resto para las muestras. Se cubrieron los frascos con 2 capas de papel kraft y se dejaron con la tapa un poco abierta. Se colocaron en el autoclave durante 25 minutos a 121 °C y 1 atm; una vez pasado este tiempo, se abrió el autoclave y se dejaron los frascos dentro toda la noche para que se enfriaran. Luego de contaminar el suelo, excepto el control, con 3 mL del mismo aceite quemado, se dejaron reposar durante 3 meses.

7.4.6. Ensayos de antagonismo

Para las 4 bacterias que presentaron presencia de lipasas extracelulares en la prueba anterior, se realizó un ensayo de antagonismo en rojo de fenol, el cual se preparó de la misma forma detallada en la sección anterior (Gururaj et al., 2016). Este se colocó en placas Petri y en las mismas se inocularon las cepas usando asa en argolla estéril. Se hicieron todas las combinaciones posibles entre bacterias, manteniendo la misma distancia entre cada inóculo. Con ello, se analizó la presencia de antagonismo entre las cepas a nivel de crecimiento y de presencia de lipasas. Se hizo lo mismo con 2 cepas de *Pseudomonas* extraídas de suelo de caña de azúcar, las cuales fueron incorporadas en los consorcios bacterianos propuestos más adelante. El objetivo fue evaluar su capacidad para formar biofilm, con el fin de mejorar la actividad enzimática del consorcio mediante una mayor cohesión entre las cepas, pero sin antagonismo con el resto de bacterias usadas.

7.4.7. Caracterización de bacterias en la tierra no estéril

Con el fin de determinar las bacterias presentes en la tierra no estéril aparte de las agregadas en el consorcio, se realizó una caracterización. Para ello, se recolectaron 5 g de cada muestra de tierra a usar y se colocaron en bolsas plásticas esterilizadas con etanol 70 %. Se mezcló 1 g de cada muestra con 10 mL de agua estéril y se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-3} . Esto se hizo al mezclar 1 mL de tierra diluida con 9 mL de agua estéril en tubos de ensayo hasta llegar a la concentración deseada. Con esta última, se hizo el método de vertido en placa al pipetear 100 μ /L de la mezcla al fondo de cada placa Petri a usar y luego vertir agar TSA encima para tener una distribución homogénea. Dicho agar se suplementó previamente con nistatina a una concentración de 20 μ g/mL (2.4 mL en 300 mL de agar) para evitar crecimiento de hongos y limitarlo solo a bacterias. Se dejaron incubando las placas a 37 °C durante 48 horas y luego se observó el crecimiento bacteriano.

Las diferentes colonias presentes en las placas se usaron para hacer estriados con asa estéril en placas de agar nutritivo con el fin de aislarlas en cultivos puros. Luego se hicieron frotos y tinciones de Gram de cada cultivo puro para analizar su morfología también a nivel microscópico, con lo cual se determinaron las características de las bacterias de la tierra (Prashanthi et al., 2021).

7.5. Preparación de extractos y perlas

7.5.1. Extracto bacteriano

Se preparó un medio para inducir la producción de lipasas en un erlenmeyer de 500 mL usando 450 mL de agua destilada y mezclando 3% de extracto de levadura (13.5 g), 3% de sacarosa (13.5 g), 0.1 g de CaSO_4 , 0.2 g de KH_2PO_4 , 0.1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1.5% de aceite de oliva (7.5 mL). En tubos Falcon de 50 mL, se hicieron alícuotas de 30 mL por bacteria. A estas se les inoculó la cepa correspondiente tomando 1-2 colonias de las placas usando una punta P100 y dejando caer esta última en el tubo. Los tubos con medio inoculado se dejaron incubando en agitación a 37 °C y 250 rpm durante 72 horas (Bharathi et al., 2019). Pasado este tiempo, los tubos se centrifugaron por 5 minutos a 7850 rpm y 25 °C, y se utilizó el sobrenadante para los siguientes ensayos. De acuerdo con la literatura, esta fracción suele concentrar las enzimas extracelulares, incluyendo lipasas, aunque en este estudio se consideró como un extracto enzimático preliminar sujeto a verificación.

7.5.2. Inmovilización de extracto bacteriano

Se preparó el mismo medio de producción de lipasas descrito y se inocularon las cepas bacterianas de la misma forma. Además, se preparó una solución de alginato de sodio al 2.5% disolviendo 11.25 g en 450 mL de agua destilada fría. Para ello se fue colocando poco a poco el alginato estéril en un erlenmeyer con el agua fría mientras se agitaba en estufa sin calentar. Se mantuvo así alrededor de 1 hora hasta disolver completamente todo el alginato sin aglutinamiento. En tubos Falcon de 15 mL, se mezclaron 4 mL de extracto de lipasas con 4 mL de la solución de alginato de sodio preparada. Se hizo lo mismo para cada bacteria y se fue agregando la mezcla gota a gota en una solución de CaCl_2 al 2.5% p/v mientras se agitaba para mejorar la forma de las perlas. Luego de 10 minutos se recolectaron las perlas formadas, las cuales se lavaron con CaCl_2 al 0.5% p/v frío y luego con agua destilada. Se hizo el mismo procedimiento para las perlas control pero mezclando 4 mL de medio de producción de lipasas con el alginato de sodio (Ji et al., 2010), (Bharathi et al., 2019).

7.5.3. Análisis de degradación y utilización de aceite

Para simular diferentes condiciones de pH, se preparó buffer de fosfatos mezclando 5.52 g de NaH_2PO_4 y 1.78 g de Na_2HPO_4 en 1 L de agua destilada. Se dividió el volumen en 2 erlenmeyers y se autoclaveó durante 30 minutos. Se midió el pH de ambos erlenmeyers usando tiras reactivas y se determinó que ambos eran de 7, por lo que uno se dejó de esa manera y el otro se ajustó a pH 6 usando HCl fumante gota a gota en campana de

extracción. Para el pH 8 se preparó buffer Tris HCl mezclando 2.36 g de Trizma HCl en 300 mL de agua destilada y de igual manera se autoclaveó por 30 minutos. Todos los buffers se guardaron en refrigeración hasta su uso.

Bacterias individuales

Con la finalidad de evaluar si las cepas seleccionadas tenían la capacidad de degradar el aceite y usarlo como fuente de nutrientes para su crecimiento, se hizo una prueba con un medio mínimo. Este se preparó en un volumen final de 100 mL de agua estéril mezclando 3 g de K_2HPO_4 , 1 g de KH_2HPO_4 , 0.5 g de NH_4Cl , 0.1 g de Na_2SO_4 , 0.1 g de NH_4NO_3 , 0.01 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001 g de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.001 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.0005 g de $CaCl_2$. Esta mezcla de sales se filtró usando un filtro de 0.2 μm y se hizo lo mismo para 3 mL de aceite para tener una concentración final de aceite de 3% v/v. Al realizar un triplicado para cada bacteria, se colocó 1 mL del medio preparado en tubos eppendorf y se inocularon las bacterias correspondientes usando puntas P100 para mezclarlas. Además, se hizo un control negativo para cada bacteria al inocularlas de la misma forma, pero en 1 mL de medio sin aceite. Por último, se preparó un blanco que solo contenía 1 mL de medio sin bacterias. Se dejaron incubando los tubos durante diez horas y, luego, se hicieron alícuotas de cada muestra mezclando 100 μL del contenido del primer tubo en 900 μL de agua estéril hasta llegar a una concentración de 10^{-6} . Se hizo lo mismo para los controles negativos. Del tubo con esta concentración, se inocularon 100 μL en una placa de agar nutritivo; se hizo lo mismo para todas las muestras. De igual manera, se inocularon 100 μL de los controles negativos y del blanco en agar nutritivo. Se incubaron las placas a 37 °C durante diez horas; pasado este tiempo, se hizo un conteo de colonias en cámara de Quebec para comparar entre los controles positivos y negativos, y el blanco con base en los datos de UFC obtenidos con la siguiente fórmula.

$$UFC/mL = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen sembrado (mL)}} \quad (1)$$

Al mismo tiempo, se prepararon tubos con 5 mL del mismo medio y se inocularon las bacterias y consorcios usando el mismo proceso. De estas muestras, se tomó una alícuota antes, a las cinco horas y a las diez horas de incubación para medir su OD_{600} y hacer una curva de crecimiento. Con base en ello, se calculó qué tanto más era capaz de crecer cada bacteria usando aceite como fuente de carbono respecto a los demás. Se tomó el dato de OD_{600} a las diez horas para cada bacteria y se usó para calcular un factor de conversión empírico para el resto de datos de OD_{600} en base a la siguiente fórmula (Beal et al., 2020).

$$\frac{UFC}{mL \text{ corregido}} = \frac{\tilde{\chi} \frac{UFC}{mL}_{10h}}{OD_{600 \ 10h}} \times OD_{600 \text{ a diferentes condiciones}} \quad (2)$$

Además, en un volumen de 1 mL del medio mínimo, se inocularon las bacterias individuales de la misma forma descrita en triplicado. Estas se incubaron a diferentes condiciones de temperatura (25, 35 y 45 °C) y pH (6, 7 y 8) durante la noche; además, se incluyó un blanco sin bacterias. Se tomó el dato de OD_{600} para cada muestra al final de su periodo

de incubación y se calculó su dato correspondiente de UFC/mL usando el mismo cálculo anterior. Se hizo lo mismo para los dos consorcios propuestos, pero no se determinó su valor de UFC/mL por ser una agrupación de bacterias.

Conorcios bacterianos

Tomando en cuenta los resultados obtenidos para los consorcios, se buscaba evaluar si estos degradaban el aceite de forma directa en ausencia de otros nutrientes y así determinar el alcance de su capacidad degradativa. Para ello, se inocularon 500 μL de cada consorcio en 25 mL del mismo aceite usado en el resto de las pruebas. También se inocularon 13 perlas de cada consorcio en el mismo volumen de aceite. Todas las muestras se dejaron incubando durante siete días a 37 °C y agitación a 150 rpm. Pasado este tiempo, se tomaron alícuotas de 1 mL de cada muestra en tubos eppendorf, los cuales se centrifugaron durante cinco minutos a 7850 rpm y 25 °C para dejar solo el posible producto hidrolizado en el sobrenadante. Este se leyó para cada muestra en equipo de FTIR marca PerkinElmer Frontier L1050101. Se compararon los espectros obtenidos y también se evaluó un control negativo que tenía solo el aceite y que no se incubó para usarlo como espectro base para comparación.

7.5.4. Medición de la estabilidad de la actividad bacteriana

Pruebas de espectrofotometría

Para todas las pruebas se pesaron 90 g de tierra autoclaveada y se colocaron en un beaker estéril. Se mezcló con 200 mL del buffer correspondiente y se fue filtrando usando gasa y papel filtro estéril. Se colocó el líquido extraído en otro beaker estéril hasta tener aproximadamente 125 mL. Dicho volumen se colocó en tubos Falcon de 50 mL estériles, los cuales se centrifugaron a 7850 rpm y 25 °C durante cinco minutos para separar los residuos de tierra y sedimento del sobrenadante que contenía el aceite. Se trabajó con treinta réplicas y tres controles para cada cepa, por lo que se usaron cinco placas de 24 pocillos para las muestras. En cada una se colocó 1 mL del sobrenadante y 500 μL del extracto de bacteria correspondiente. Se dejaron incubando las placas con agitación media durante treinta minutos para cada condición de temperatura y pH descritas, usando buffer para variar este último factor. Pasado este tiempo, se transfirieron 200 μL del volumen total de cada pozo a placas de noventa y seis pocillos. Se midió la absorbancia a 405 nm usando el mismo lector de placas y se registraron los datos obtenidos.

También se quería evaluar la estabilidad en perlas, por lo que se colocaron trece perlas en cinco pozos de una placa de doce pocillos junto a 1 mL de sobrenadante preparado antes, y se hizo lo mismo para el control en un solo pozo. Se incubaron las placas durante treinta minutos a las condiciones de pH y temperatura óptimas para cada bacteria según los resultados de las pruebas anteriores. De igual forma, se transfirieron 200 μL del volumen de cada pozo a placas de 96 pocillos y se midió su absorbancia a 405 nm.

7.5.5. Pruebas de espectrofotometría con consorcios bacterianos

Preparación de consorcios bacterianos

En base a los resultados obtenidos en las pruebas enzimáticas y de antagonismo, se seleccionaron las cepas con mayor absorbancia y estabilidad para formar el consorcio.

Consorcio como extracto De igual forma, se dejaron incubando las cepas en 30 mL de medio de producción de lipasas a 37 °C y 120 rpm durante setenta y dos horas, incluyendo las dos cepas de *P. paraglyciniae* seleccionadas (Minnikova et al., 2023). Se hizo una medición de OD_{600} de cada solución para asegurar que tuvieran concentraciones similares y se mezclaron 250 μ L de cada bacteria seleccionada en 25 mL de medio de producción de lipasas en tubos Falcon de 50 mL para formar dos consorcios, uno con cada *Pseudomonas*. Se dejaron incubando los tubos durante veinticuatro horas a 37 °C y 150 rpm. Pasado este tiempo, se colocaron 500 μ L del consorcio bacteriano 5 pozos más 1 control y se incubaron las placas a 35 °C y pH 7 durante treinta minutos ya que fueron las condiciones óptimas según los ensayos anteriores. Se realizaron las mismas mediciones espectrofotométricas a 405 nm en placas de noventa y seis pocillos usando 200 μ L de cada reacción.

Consorcio como perlas inmovilizadas Se hizo el mismo procedimiento explicado en la sección de inmovilización pero con 4 mL de cada consorcio y 4 mL de alginato de sodio. También se incubaron a 35 °C y pH 7 durante treinta minutos y se midió la absorbancia a 405 nm.

7.5.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos para la absorbancia de la actividad lipolítica bacteriana a diferentes condiciones de temperatura y pH se analizaron usando RStudio v2024.12.0. Con ello se hizo un análisis de aspectos como colinearidad, datos atípicos y tamaño de los efectos de los factores que influyen en la actividad enzimática. El análisis de los datos registrados para la absorbancia de los extractos inmovilizados en perlas y de los consorcios se hizo en Microsoft Excel. Con ello, se obtuvieron las estadísticas descriptivas correspondientes a cada grupo de datos.

8.0.1. Características de las cepas bacterianas seleccionadas

La caracterización morfológica permitió identificar las cepas bacterianas que cumplieran con los criterios microscópicos esperados y que además producían lipasas extracelulares (Cuadro 2).

Cuadro 2. Caracterización de las cepas bacterianas

Código cepa	Bacteria	Tinción de Gram	Lipasas extracelulares
2AB4	<i>B. megaterium</i>	Bacilos Gram positivos	+
1AP11	<i>Bacteria no identificada</i>	Bacilos Gram positivos	+
1BP6	<i>B. cereus</i>	Bacilos Gram positivos	+
1AP18	<i>B. cereus</i>	Bacilos Gram positivos	+
1AP20	<i>Staphylococcus sp.</i>	Cocos Gram positivos	+
1AP5	<i>B. paramycoides</i>	Bacilos Gram positivos	+
2MO6	<i>P. paraglycinae</i>	Bacilos Gram negativos	-
2MO7	<i>P. paraglycinae</i>	Bacilos Gram negativos	-

Nota. Elaboración propia.

Aquellas bacterias que presentaron la morfología esperada se incluyeron en una prueba de rojo fenol para identificar presencia de lipasas extracelulares. Como se muestra en la tabla anterior, se identificaron cuatro bacterias que cumplieran con ambos criterios (*B. megaterium*

2AB4, *B.cereus* 1AP18, *Staphylococcus sp.* 1AP20 y *B.subtilis* 1BP6), las cuales se usaron en el estudio. Dos de las bacterias que presentaron lipasas extracelulares no se incluyeron en las siguientes fases. En el caso de una de ellas, la morfología observada en las tinciones de Gram no correspondía con la registrada en el cepario. La otra cepa presentó contaminación cruzada con otra colonia bacteriana varias veces, por lo que se optó por no usarla para evitar sesgos en los resultados y asegurar la reproducibilidad de los experimentos.

8.0.2. Antagonismo de las cepas bacterianas seleccionadas

Se realizaron pruebas de antagonismo con la bacterias seleccionadas y se sumaron dos más. Estas últimas eran 2MO6 y 2MO7, ambas *P. paraglycinae*, las cuales se tomaron en cuenta debido a su posible potencial de formación de biofilm, una característica deseable en la construcción de los consorcios.

Cuadro 3. Antagonismo bacteriano en agar rojo de fenol

	2AB4	1BP6	1AP18	1AP20	2MO6	2MO7
2AB4						
1BP6						
1AP18						
1AP20						
2MO6						
2MO7						

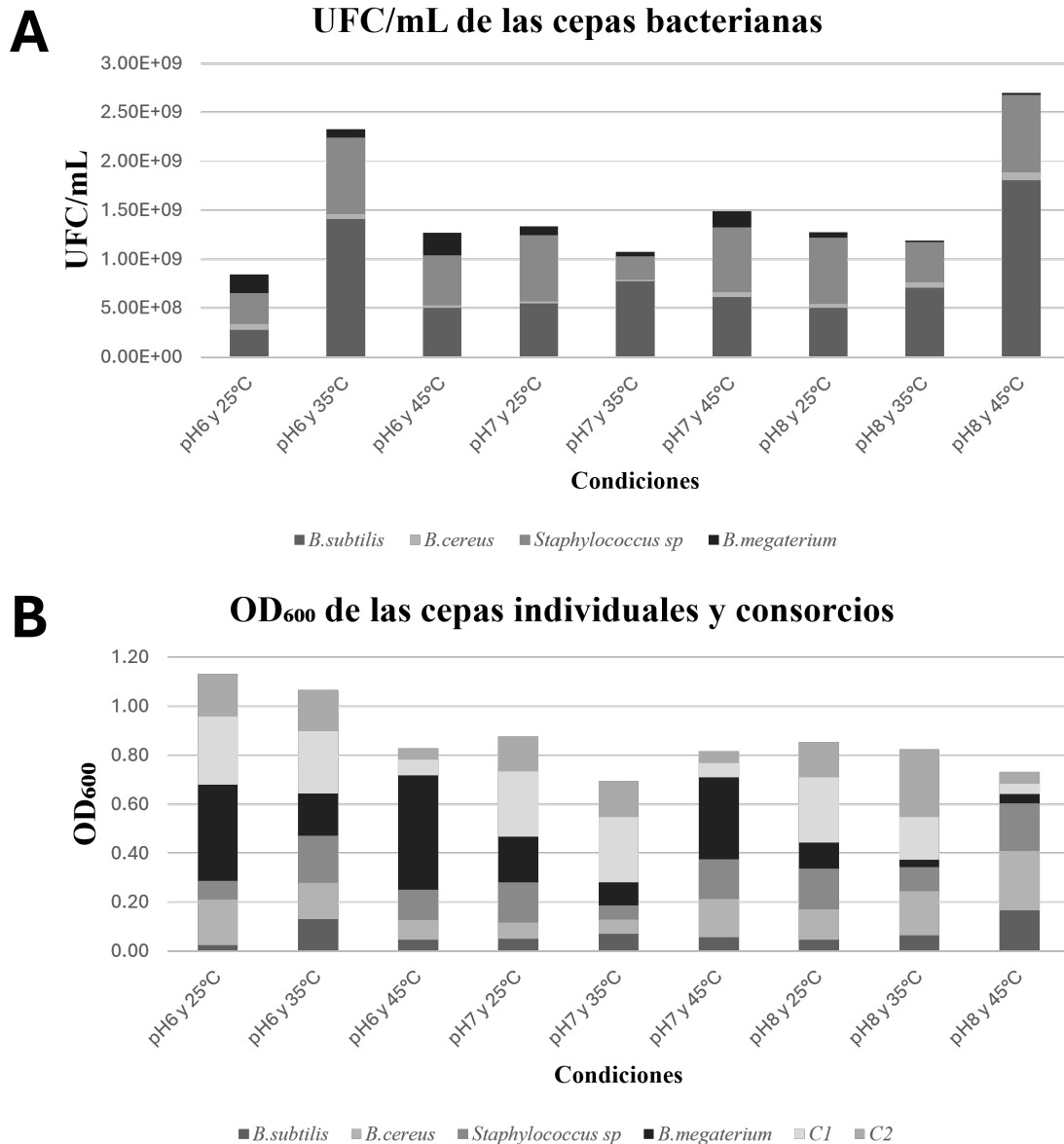
Nota. Elaboración propia.

El antagonismo entre las bacterias se marcó con un sombreado color azul, donde la cepa de la columna presentó mayor crecimiento que la de la fila. Las cepas 2AB4 y 1AP20 presentaron menor actividad antagonista frente al resto de las cepas, incluyendo 2MO6 y 2MO7. En esta evaluación, se tomó en cuenta si había inhibición en la producción de lipasas extracelulares por medio de cambio de color en el agar rojo fenol, otro aspecto que se tomó en cuenta en la selección de las cepas (Cuadro 3).

8.0.3. Uso del aceite de parte de las cepas bacterianas

Para las bacterias inoculadas en medio mínimo, se observaron diferencias significativas en la cantidad de UFC/mL que generaron. Se observó algo similar en las mediciones de OD_{600} tanto para las cepas individuales como para los dos consorcios planteados. Estas mediciones permitieron comparar el crecimiento conjunto frente al individual y evaluar la dinámica de aprovechamiento del aceite como fuente de carbono en cada caso (Figura 10).

Figura 10. Viabilidad y crecimiento de las cepas y los consorcios en medio mínimo

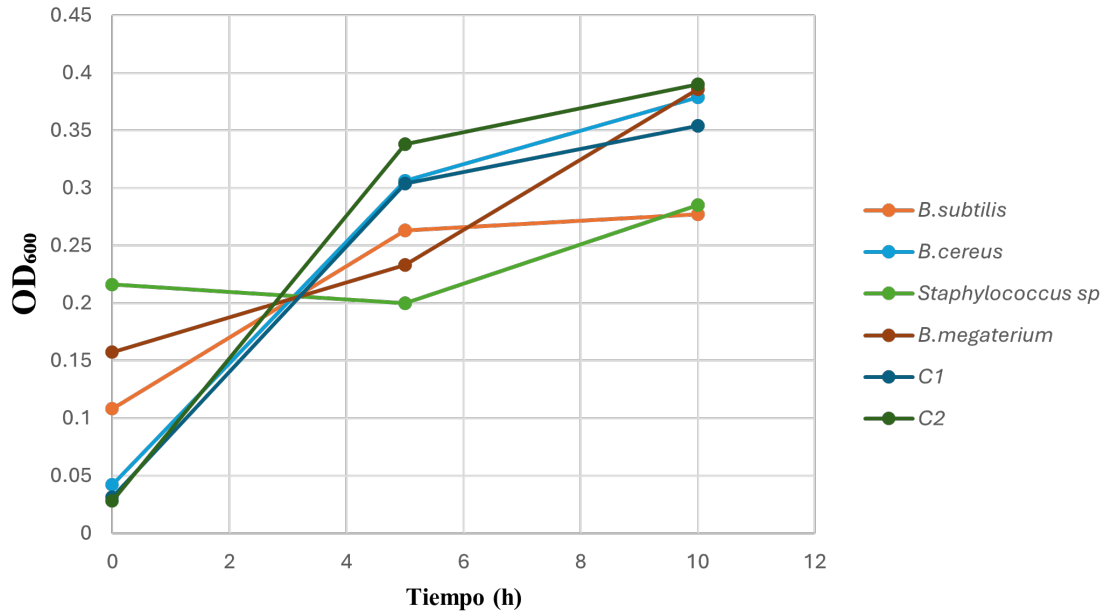


Nota. Se calculó el valor de **A.** UFC/mL para las cepas individuales luego de un periodo de 10 horas y **B.** OD₆₀₀ de las cepas individuales y los 2 consorcios evaluados (C1 y C2) en el mismo periodo de tiempo. Tomando en cuenta que en inóculos mezclados como los consorcios el cálculo de UFC/mL se complica debido a la presencia de diferentes cepas, se optó por no realizar esta estimación y tomar la densidad óptica como medida comparativa del crecimiento. Elaboración propia.

La bacteria *B. subtilis* mostró el valor más alto de UFC/mL y por ende mayor viabilidad en presencia del aceite, seguido de *Staphylococcus sp.* en todas las condiciones. En cambio, *B. cereus* y *B. megaterium* fueron las que presentaron menos viabilidad también en todas las condiciones evaluadas, siendo casi nula en algunas ocasiones. Por ende, las primeras dos cepas tienen un metabolismo más adaptado al uso del aceite, mientras que en las otras

es un factor más limitante. En cuanto a los datos obtenidos para OD_{600} , se observó un comportamiento diferente, donde *B. megaterium* y el consorcio 1 presentaron mayor densidad en la mayoría de las condiciones. Sin embargo, para ambos casos, los comportamientos de las bacterias varían entre condiciones, es decir que no hay una preferencia clara por una determinada condición.

Figura 11. Curvas de crecimiento bacteriano en medio mínimo



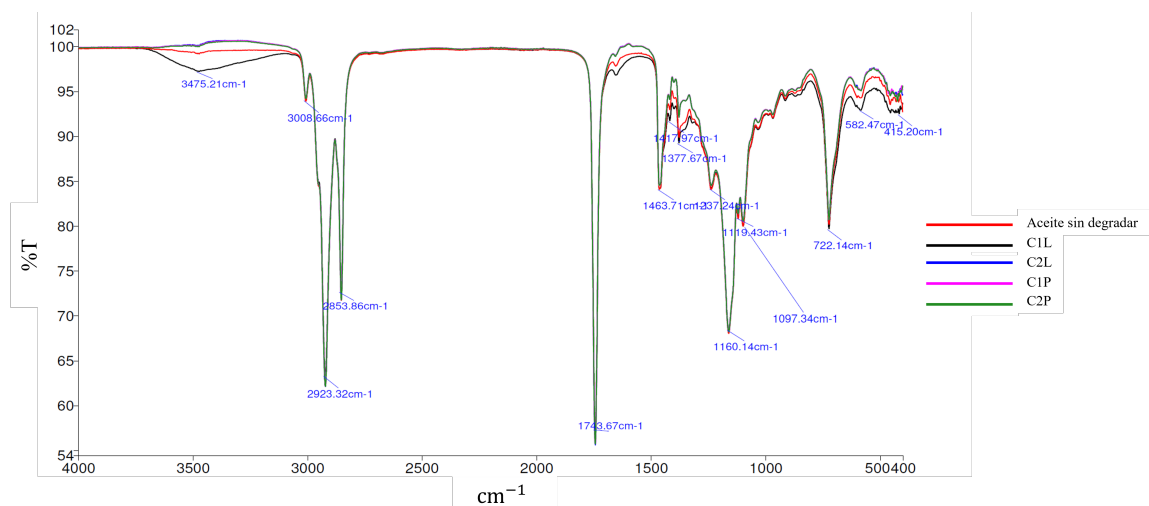
A lo largo de un periodo de 10 horas, se evaluó la densidad óptica tanto de las cepas individuales como de los 2 consorcios evaluados (C1 y C2). Nota. Elaboración propia.

Al mismo tiempo, al realizar curvas de crecimiento de las cepas individuales y en consorcio en medio mínimo, se observó que *B. megaterium* y el segundo consorcio (C2) alcanzaron las mayores densidades ópticas al final del periodo de incubación, lo que indica una mayor capacidad de adaptación y aprovechamiento del medio limitado. En contraste, *Staphylococcus sp.* y *B. cereus* presentan curvas más planas, lo que sugiere un crecimiento más lento o una menor eficiencia metabólica bajo estas condiciones (Figura 11).

8.0.4. Degradación del aceite de parte de los consorcios bacterianos

Con la finalidad de comprobar que hubiera una degradación del aceite de forma más directa en los consorcios, se analizaron los espectros del aceite antes y después de exponerlo a los consorcios bacterianos. Estos últimos se evaluaron tanto en forma libre como de perlas, por lo que también se analizó esta variable.

Figura 12. Espectros de FTIR de aceite sin degradar y muestras tratadas con consorcios



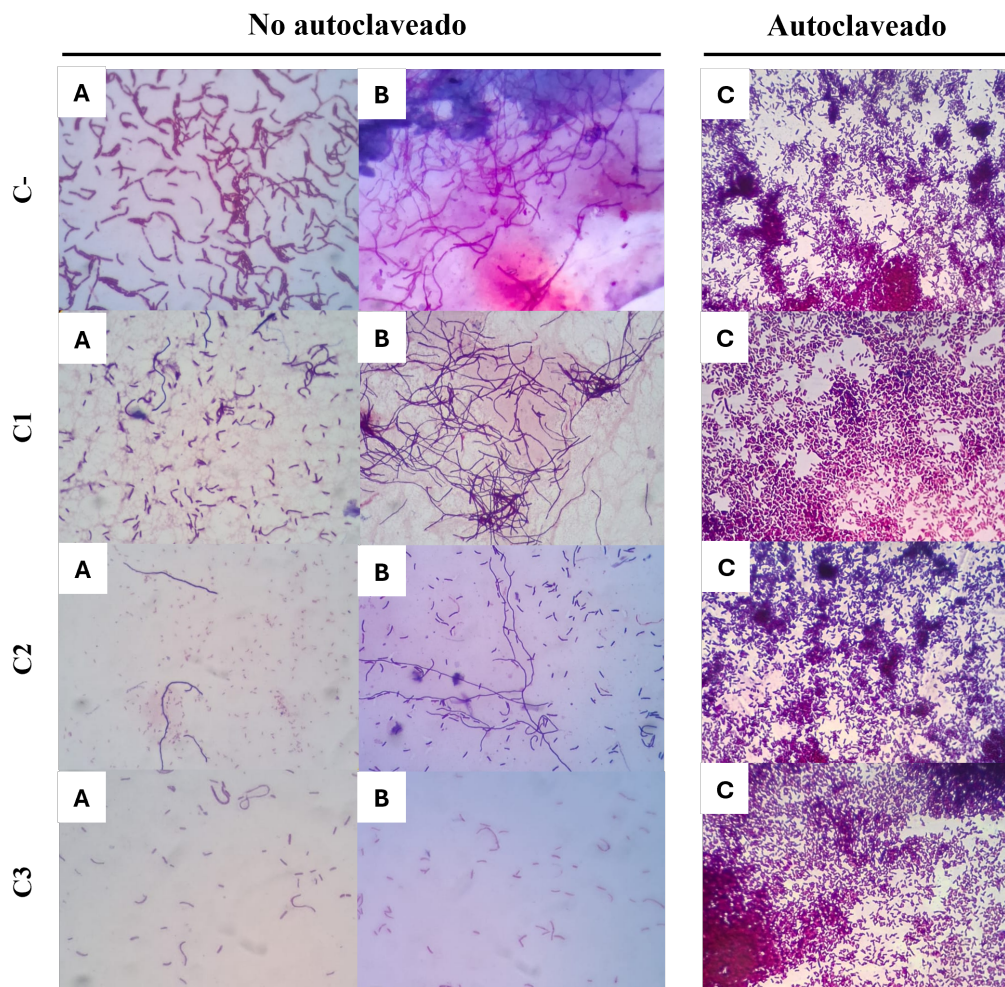
Nota. Se comparó la capacidad de degradación de los consorcios 1 y 2 en su forma de extracto libre (C1L, C2L) y de extracto inmovilizado en perlas de alginato (C1P y C2P) respecto al control, que era aceite sin tratamiento y por ende sin degradar. Elaboración propia.

La región de C-H alifático (entre 2923 cm^{-1} y 2853 cm^{-1}) es consistente en todas las muestras, lo que indica que las cadenas grasas permanecen intactas. Sin embargo, en la región de alta frecuencia, se observa una disminución de la transmitancia y la aparición de una banda ancha alrededor de 3475 cm^{-1} en la muestra C1L que no está presente en el aceite sin degradar. Además, se observa una disminución de las bandas en la región incluida entre 1244 cm^{-1} y 1190 cm^{-1} para las muestras C1P y C2P respecto al control no degradado (Figura 12).

8.0.5. Caracterización del suelo usado

Se hizo un análisis microbiológico del suelo usado para los ensayos con la finalidad de identificar las bacterias ya presentes en el mismo y compararlas con lo observado luego del proceso de autoclaveado. Con ello sería posible establecer una línea base para analizar si estas tenían un papel o influencia en la absorbancia y resultados observados. El suelo no autoclaveado presentó principalmente dos morfologías bacterianas: bacilos Gram positivos ligeramente alargados sin esporas y actinomicetos Gram positivos. En contraste, en la tierra que sí fue autoclaveada se observaron solo bacilos Gram positivos pequeños pero en grandes cantidades (Figura 13).

Figura 13. Bacterias observadas en el suelo



Nota. Bacterias observadas en las muestras control (C-), y contaminadas con aceite (C1, C2, C3) en el suelo autoclaveado (A y B) y no autoclaveado (C). Elaboración propia.

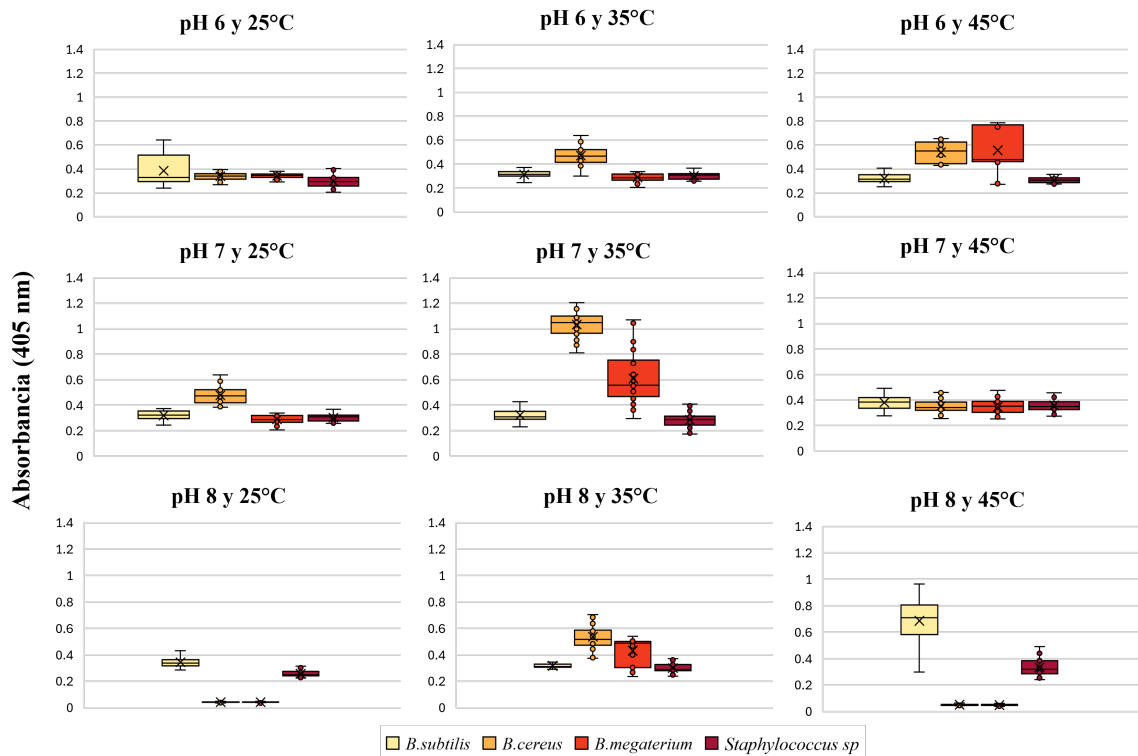
8.0.6. Absorbancia de las cepas bacterianas a 405 nm

Extracto bacteriano

Se expusieron las cuatro cepas seleccionadas a diferentes condiciones de pH (6, 7 y 8) y temperatura (25 °C, 35 °C y 45 °C) y se midió su absorbancia. Así, se registraron los valores de absorbancia calculados para observar su comportamiento dependiendo del tratamiento aplicado. Esto se hizo tanto para el aceite en el suelo autoclaveado como no autoclaveado.

En el caso de la absorbancia registrada para el aceite del suelo no autoclaveado, las interacciones de pH 6-7 y temperaturas de 25 °C y 35 °C favorecieron valores más altos, principalmente en las bacterias *B.subtilis* y *B.cereus*. En general, la absorbancia disminuyó a pH 8 y 45 °C, donde *B.megaterium* y *Staphylococcus sp.* mostraron los niveles más bajos (Figura 14).

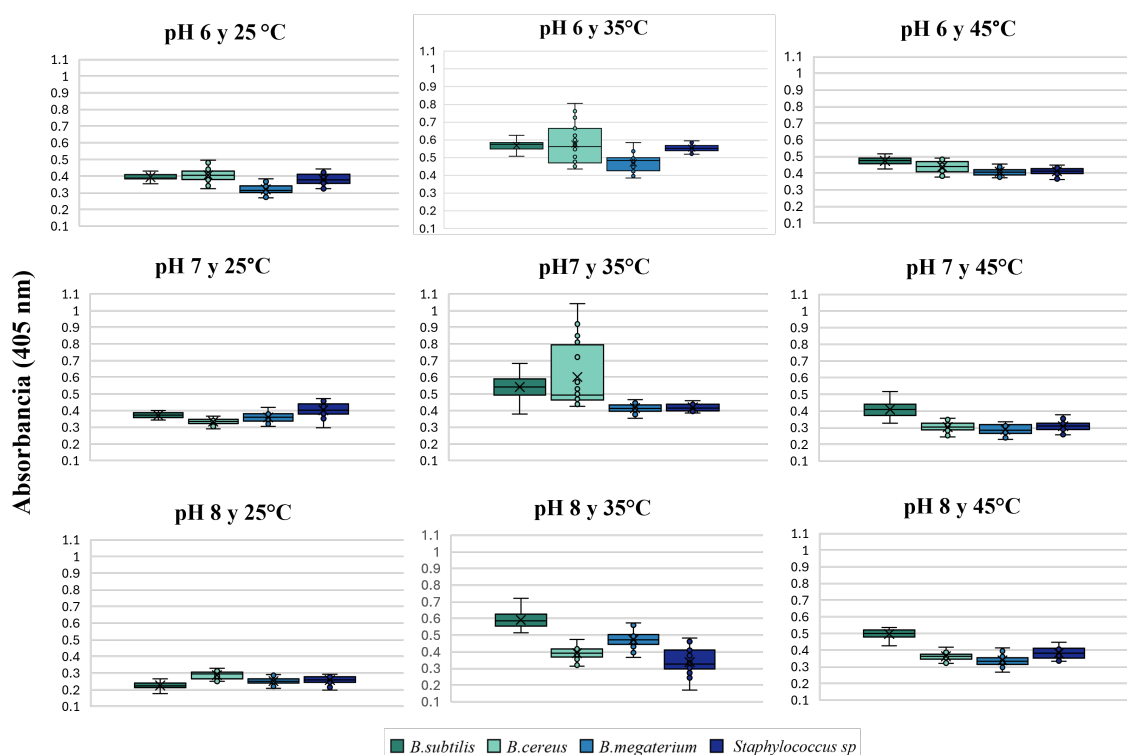
Figura 14. Absorbancia a 405 nm de las cepas bacterianas en el aceite del suelo no autoclaveado



Nota. Elaboración propia.

Por otro lado, se observó una absorbancia menor para las pruebas hechas en el suelo autoclaveado. Aún así, *B. subtilis* volvió a presentar la mayor absorbancia, en particular a pH 6-7 y 35 °C. Al mismo tiempo, *B. cereus*, *B. megaterium* y *Staphylococcus sp.* mostraron valores reducidos, sobre todo en pH 8 y 25 °C (Figura 15).

Figura 15. Absorbancia a 405 nm de las cepas bacterianas en el aceite del suelo autoclaveado



Nota. Elaboración propia.

En conjunto, las mejores condiciones para la absorbancia se observaron sin autoclavar, en pH 7 y 35 °C, por lo que se usaron estas condiciones para las pruebas con perlas y consorcios, mientras que la eliminación de algunas bacterias del suelo tras autoclavar redujo la absorbancia en todas las especies.

Asimismo, para comprobar la influencia de las variables consideradas en la absorbancia, se hizo un análisis en RStudio v2024.12.0 mediante el planteamiento de modelos lineales, tanto en escala original como con corrección logarítmica, utilizando por separado las bases de datos correspondientes a suelo autoclaveado y no autoclaveado.

En el caso del suelo no autoclaveado, el modelo lineal simple muestra el AICc mínimo de -538.4 y un peso de Akaike de 1, mientras que el modelo log-transformado tiene un AICc considerablemente mayor (1965.7), lo que indica una capacidad explicativa nula en comparación con el otro modelo. Para el suelo autoclaveado, el modelo lineal simple también es el mejor. Presenta un AICc negativo (-1792.6) y un peso igual a 1. Por el contrario, el modelo log-transformado no tiene soporte debido a que su peso es de 0. En conjunto, estos resultados sugieren que la transformación logarítmica aplicada reduce el ajuste en ambas condiciones, siendo el modelo lineal simple el que mejor describe lo observado en los dos tipos de suelo (Cuadro 4).

También se realizó un análisis de regresión utilizando como variable de respuesta la absorbancia. Esta aproximación permitió evaluar el efecto individual de los factores involucrados, facilitando la comparación entre ambos tipos de suelo.

Cuadro 4. Parámetros de regresión para los modelos seleccionados en suelos autoclaveados y no autoclaveados

Variable	Tamaño del efecto (β)	SE	LCI	UCI
No autoclaveado: lm(Absorbancia)				
Intercepto	0.61210	0.05667	0.50089	0.72331
Temperatura	0.00335	0.00071	0.00195	0.00476
pH	-0.04365	0.00721	-0.05781	-0.02950
<i>B.megaterium</i>	-0.09462	0.01633	-0.12668	-0.06258
<i>B.subtilis</i>	-0.04692	0.01670	-0.07969	-0.01415
<i>Staphylococcus sp.</i>	-0.12202	0.01645	-0.15430	-0.08974
Autoclaveado: lm(Absorbancia)				
Intercepto	0.62002	0.03032	0.56052	0.67951
Temperatura	0.00261	0.00037	0.00187	0.00334
pH	-0.04312	0.00379	-0.050551	-0.03569
<i>B.megaterium</i>	-0.04082	0.00865	-0.05780	-0.02384
<i>B.subtilis</i>	0.03767	0.00870	0.02060	0.05473
<i>Staphylococcus sp.</i>	-0.03116	0.00870	-0.04823	-0.01409

Nota. Se obtuvieron los parámetros de regresión de los modelos seleccionados, estimados automáticamente en R utilizando a *B. cereus* como variable de referencia. Por ende, los coeficientes asociados a las demás cepas bacterianas, tanto en suelo autoclaveado como sin autoclavar, reflejan su comportamiento relativo respecto a *B. cereus*. Por otro lado, los efectos de temperatura y pH corresponden a factores continuos que se aplican de manera general a todas las cepas incluidas en el modelo. Elaboración propia.

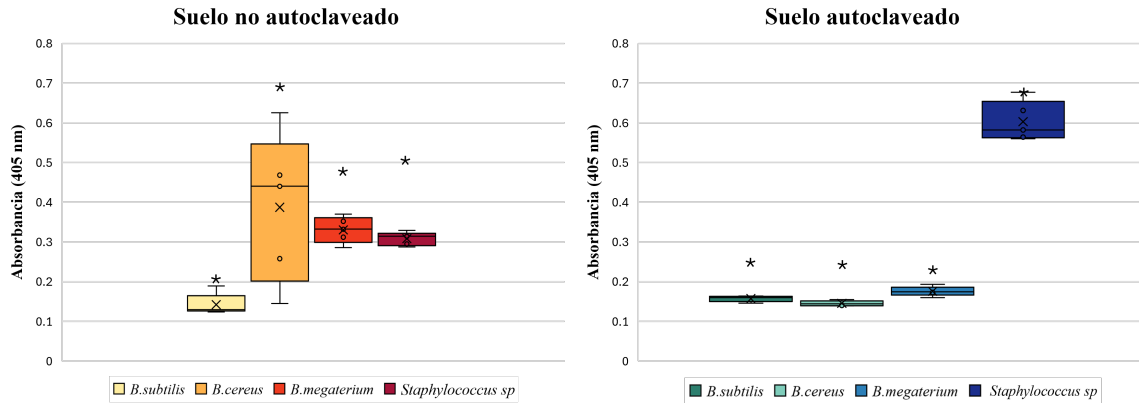
En el suelo no autoclaveado, todas las variables mostraron un efecto significativo sobre la absorbancia, ya que sus intervalos de confianza excluyen el cero. Tanto la temperatura como el pH fueron predictores importantes (Figura 18). La primera tuvo un efecto positivo ($\beta = 0.00335$), por lo que un aumento de la temperatura se asocia con una mayor absorbancia. Al contrario, el pH tuvo un efecto negativo ($\beta = -0.04365$), indicando que aumentar el pH se asocia con una menor absorbancia. Las cepas *B. megaterium* ($\beta = -0.09462$), *B. subtilis* ($\beta = -0.04692$) y *Staphylococcus sp.* ($\beta = -0.12202$) también presentaron efectos negativos respecto a *B. cereus*, que mostró mayor absorbancia en la mayoría de las condiciones. En el suelo autoclaveado todas las variables también tuvieron un efecto significativo en la absorbancia, aunque en magnitudes menores. La temperatura tuvo un efecto positivo ($\beta = 0.00261$), y el pH tuvo un efecto negativo claro ($\beta = -0.04312$). Las cepas *B. megaterium* y *Staphylococcus sp.* continuaron mostrando efectos negativos ($\beta = -0.04082$ y $\beta = -0.03116$, respectivamente). Sin embargo, *B. subtilis* fue la única variable bacteriana que mostró un efecto positivo significativo ($\beta = 0.03767$), sugiriendo una asociación con un ligero incremento en la absorbancia (Cuadro 4).

8.0.7. Comparación de absorbancia en perlas y consorcios

Extracto bacteriano inmovilizado en perlas

En base a los resultados obtenidos para la absorbancia de las cepas individuales, se seleccionaron las condiciones a las cuales se hicieron las pruebas para las perlas.

Figura 16. Absorbancia a 405 nm de las cepas inmovilizadas en perlas



Nota. Se comparó la absorbancia de los extractos de bacterias inmovilizados en perlas bajo pH 7 y 35 °C, ya que fueron las condiciones con mayores valores de absorbancia en pruebas anteriores. Elaboración propia.

Se complementó el análisis de las gráficas con los valores correspondientes a los estadísticos de media, desviación estándar y coeficiente de variación. Estos permiten cuantificar la dispersión y consistencia de la absorbancia observada para comparar entre cepas.

Cuadro 5. Estadística descriptiva de la absorbancia de las cepas en perlas

Condición del suelo	Muestra	Media (\bar{x})	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
No autoclaveado	<i>B. subtilis</i>	0.157	0.00742	4.724
	<i>B. cereus</i>	0.145	0.00653	4.500
	<i>B. megaterium</i>	0.176	0.01190	6.771
	<i>Staphylococcus sp.</i>	0.609	0.05018	8.324
Autoclaveado	<i>B. subtilis</i>	0.142	0.0269	18.968
	<i>B. cereus</i>	0.387	0.1879	48.527
	<i>B. megaterium</i>	0.330	0.0330	9.978
	<i>Staphylococcus sp.</i>	0.308	0.0169	5.472

Nota. Elaboración propia.

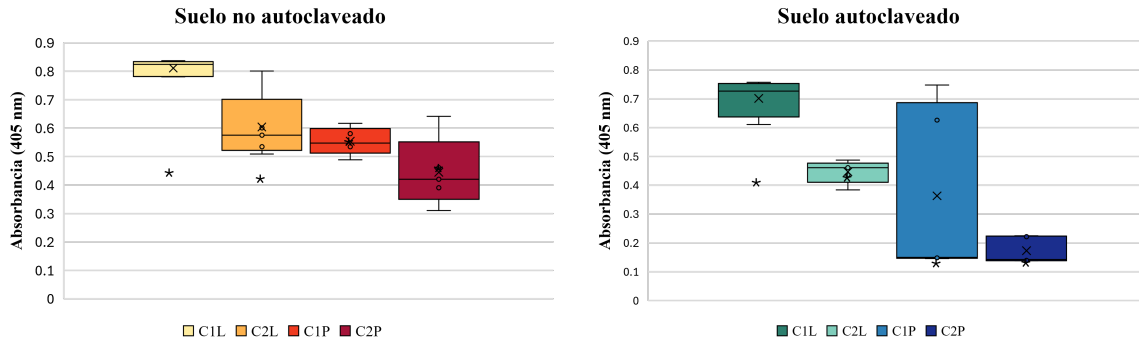
En el suelo no autoclaveado, la media de las cepas *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. megaterium* se encontró en un rango similar (0.145 a 0.176), siendo *B. megaterium* la más alta (0.176) y *B. cereus* la más baja (0.145). La cepa *Staphylococcus sp.* mostró una absorbancia media significativamente mayor (0.609). Asimismo, la dispersión fue baja en todas las cepas (CV en el rango de 4.500 a 8.324), lo cual se muestra en la distribución estrecha de los valores de absorbancia.

Por otro lado, en el suelo autoclaveado, *B. cereus* mostró la mayor absorbancia media (0.387), más del doble de la de *B. subtilis* (0.142). *B. megaterium* (0.330) y *Staphylococcus sp.* (0.308) tuvieron valores de absorbancia intermedios, pero similares entre sí. Sin embargo, *B. cereus* mostró una dispersión alta (48.527%), lo cual se refleja en un rango intercuartílico más amplio (Figura 16). Los valores correspondientes a *B. megaterium* (9.978 %) y *Staphylococcus sp.* (5.472 %) fueron mucho más consistentes entre sí, además de menores a comparación del resto de las cepas (Cuadro 5).

ConSORCIOS bacterianos

Se realizó el mismo análisis para los consorcios bacterianos, observando tanto los valores de absorbancia de forma gráfica como su estadística descriptiva.

Figura 17. Absorbancia a 405 nm de los consorcios bacterianos



Nota. Se obtuvieron los valores de absorbancia para los consorcios evaluados, tanto en extracto libre (C1L y C2L) e inmovilizados en perlas (C1P y C2P). Elaboración propia

Cuadro 6. Estadística descriptiva de la absorbancia de los consorcios

Condición del suelo	Muestra	Media (\bar{x})	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
No autoclaveado	C1L	0.811	0.0273	3.370
	C2L	0.604	0.1156	19.131
	C1P	0.554	0.0483	8.713
	C2P	0.445	0.0152	27.762
Autoclaveado	C1L	0.701	0.0626	8.920
	C2L	0.447	0.0395	8.844
	C1P	0.363	0.2985	82.153
	C2P	0.173	0.0457	26.410

Nota. Se obtuvieron las estadísticas descriptivas para los datos de absorbancia observados en el caso de ambos consorcios evaluados, tanto en extracto libre (C1L y C2L) e inmovilizados en perlas (C1P y C2P). Elaboración propia

En el caso del suelo no autoclaveado, la muestra C1L (consorcio 1 en formato libre) presentó la absorbancia más alta y estable, con una media de 0.811 y un coeficiente de variación de 3.370. En este suelo, la estabilidad general fue alta, siendo C2P la menos estable con $CV=27.762\%$. En general, la inmovilización en perlas (C1P y C2P) presentó una tendencia a reducir la absorbancia media en ambos consorcios a comparación del formato libre (C1L y C2L). De forma similar, en el suelo autoclaveado fue también la muestra C1L (0.701) la que tuvo mayor absorbancia y estabilidad ($CV=8.920\%$) (Cuadro 6). Además, la muestra C1P (consorcio 1 en perlas) presentó la mayor inestabilidad de todo el estudio, con $CV=82.153\%$, debido a su rango muy amplio de valores (Figura 17).

Para las pruebas de crecimiento con medio mínimo y medición de absorbancia se obtuvieron controles como parte de la validación de los datos obtenidos, mostrados como (*) en las gráficas pertinentes y de manera complementaria en la sección de anexos. Se esperaba tener valores menores en los controles que en las muestras experimentales, debido a que esto indica que, a falta de bacterias o consorcios, no se presentaría liberación de los compuestos absorbentes a 405 nm. Para la mayoría de los casos esto se cumplió, con excepción de algunos datos que presentaron absorbancia mayor al control. Debido a que son pocos casos, se atribuye principalmente a una variación experimental y no afecta significativamente la validación de los datos.

8.0.8. Métodos metabolómicos para la caracterización de compuestos de degradación en suelo

Considerando que se evidenció un cambio metabólico de parte de las bacterias evaluadas en el suelo, potencialmente asociado a rutas lipolíticas y a las enzimas implicadas, se procedió a identificar los métodos más adecuados para el análisis de la muestra mediante enfoques metabolómicos. El objetivo fue reconocer los compuestos vinculados con la absorbancia observada. En base a las características específicas de la muestra, se seleccionaron y evaluaron distintos métodos, analizados en términos de sus ventajas y limitaciones.

Cuadro 7. Métodos metabolómicos para la caracterización de compuestos de degradación en suelo

Método / Herramienta	Función	Ventajas	Desventajas
Identificación o perfilamiento de compuestos			
GC-MS	Identificación de metabolitos volátiles y semi-volátiles, incluyendo subproductos de degradación	Alta sensibilidad. Adecuado para compuestos volátiles pequeños	Limitado a compuestos termoestables. Requiere derivatización
LC-MS	Detección de metabolitos polares y no volátiles, incluyendo intermediarios de degradación	Amplia cobertura. Alta sensibilidad	Efectos de matriz pueden complicar la interpretación
NMR	Información estructural y cuantificación en mezclas complejas	No destructivo. Mínima preparación de muestras	Menor sensibilidad. Menor efectividad en baja concentración
FT-ICR-MS	Caracterización de compuestos con resolución ultraalta	Resolución extremadamente alta	Equipo costoso. Requiere expertos
PLFA	Perfilamiento de cambios microbianos por ácidos grasos fosfolipídicos	Relaciona cambios ambientales con comunidades microbianas	Cuantificación limitada. Baja especificidad química
Clasificación de compuestos			
CANOPUS	Predicción de clases químicas a partir de espectros MS/MS	Clasifica sin identificación previa. Se adapta a matrices complejas	Requiere espectros de alta calidad. No útil con baja fragmentación
TurboPutative	Clasificación y anotación automática de datos LC-MS	Reduce curación manual. Filtra por clases y rutas	Depende de bases de datos. Puede excluir compuestos no anotados
ChemRICH	Agrupación de metabolitos por similitud química	No depende de rutas. Útil para compuestos no mapeados	Menor resolución estructural. No identifica rutas específicas
Selección de rutas metabólicas			
Machine learning	Predicción de rutas metabólicas a partir de redes de metabolitos	Detecta patrones emergentes. Integra datos multi-ómicos	Requiere entrenamiento robusto. Riesgo de interpretación errónea
KEGG	Mapeo de metabolitos en rutas metabólicas conocidas	Método tradicional. Visualiza rutas de degradación	Limitado a rutas representadas en la base de datos

Nota. Adaptado de (Y. Q. Li et al., 2023; Y. Lu et al., 2023; Nanekar y Kokitkar, 2024; Dührkop et al., 2020; Barupal y Fiehn, 2017; Quest et al., 2010).

La acumulación de residuos grasos provenientes de actividades industriales representa un problema ambiental significativo, en especial en sectores que incluyen el procesamiento de aceites y grasas, y otras actividades agroindustriales que generan desechos lipídicos persistentes. Estos residuos no siempre se dispersan fácilmente por procesos biogeoquímicos, sino que se mantienen adheridos al suelo o sedimento, generando un impacto negativo tanto ecológico como económico. La biodegradación de grasas ha surgido como una estrategia clave para mitigar la contaminación ambiental generada por residuos lipídicos, especialmente en suelos impactados por procesos de origen industrial.

En este contexto, los microorganismos han despertado gran interés por su capacidad de descomponer lípidos a través de procesos metabólicos mediados por enzimas lipolíticas, transformándolos en compuestos más simples y menos tóxicos. Estos productos pueden ser aprovechados por las bacterias para sobrevivir y crecer en condiciones donde los lípidos constituyen la principal o única fuente de carbono, ya que la hidrólisis enzimática representa la vía más directa para incorporar dichos compuestos a sus rutas metabólicas convencionales. Algunas bacterias muestran una preferencia clara por los compuestos del aceite frente a otras fuentes de energía, mientras que otras tienen un metabolismo más versátil que permite usar varias fuentes de nutrientes, incluyendo el aceite, activando la maquinaria enzimática necesaria cuando los hidrocarburos, de sus principales componentes, se encuentran disponibles en abundancia (American Society for Microbiology (ASM), 2011). Diversos trabajos han empleado medios mínimos suplementados solo con grasas como fuente de carbono para evaluar la capacidad de crecimiento bacteriano y, de manera indirecta, comprobar la actividad de enzimas lipolíticas extracelulares. Estos demuestran que al exponer consorcios microbianos a medios mínimos con aceite o compuestos similares se da un enriquecimiento de genes que codifican para surfactantes (Araújo et al., 2020). Derivado de esto, se mejora la solubilidad de las grasas para que enzimas como las lipasas actúen sobre ellas, aumentando la capacidad de degradación.

Las pruebas con medio mínimo realizadas en el presente estudio se analizaron en base a los resultados de estimación de UFC/mL por bacteria. Estos mostraron que *B. subtilis* tiene el mayor potencial de crecimiento incluso en condiciones de pH y temperatura elevadas, usando aceite como única fuente de carbono. Sin embargo, el pH 7 fue el punto de mayor estabilidad, lo que coincide con estudios sobre comportamiento bacteriano en diferentes condiciones, donde se ha reportado que el pH neutro representa un rango de mayor estabilidad metabólica y funcional (Mougi, 2024). Este comportamiento sugiere que *B. subtilis* posee una capacidad adaptativa distinta, lo cual puede justificar el antagonismo observado en pruebas previas, derivado de su rápido aprovechamiento del sustrato lipídico. En contraste, *Staphylococcus spp.* y *B. cereus* presentaron curvas más planas, por lo que su eficiencia metabólica podría ser menor estando por sí solas, pero no necesariamente en todas las condiciones.

Varios autores han señalado que ningún organismo por sí solo puede degradar los miles de componentes que conforman el aceite ya que por lo general solo pueden degradar algunas clases de hidrocarburos, pero no todos. Por ende, se requiere de comunidades de microorganismos actuando en conjunto para degradar un alto porcentaje del aceite (American Society for Microbiology (ASM), 2011). De esta noción surge el interés de evaluar la biodegradación bacteriana del aceite no solo de forma individual, sino también en agrupación o consorcio. En general, se observó que *B. megaterium* y *Staphylococcus spp.* mostraron niveles de absorbancia intermedios, pero con mayor consistencia y menor variabilidad, lo que los convierte en candidatos más confiables para aplicaciones reproducibles. Estas dos cepas fueron seleccionadas para ambos consorcios, a pesar de que *Staphylococcus spp.* tuvo menor eficiencia de utilización del aceite, principalmente por presentar menor antagonismo frente a las demás cepas evaluadas, sin interferir en la producción de lipasas extracelulares. Esta compatibilidad es clave en un consorcio funcional, ya que permite mantener la actividad enzimática sin inhibiciones cruzadas, favoreciendo la cooperación metabólica y la eficiencia degradativa en ambientes complejos (Ebadi et al., 2021).

A los consorcios formados se les agregó una cepa de *P. paraglycinae*, el primero con la cepa 2MO6 y el segundo con 2MO7. Esto se hizo con el objetivo de determinar si existían variaciones en el comportamiento de los consorcios que pudieran atribuirse a diferencias entre las cepas de *Pseudomonas*, en especial en aspectos relacionados con la estabilidad comunitaria y la posible formación de biofilm. Aunque estas cepas pertenecen a la misma especie, su clasificación como cepas separadas indica diferencias funcionales a nivel metabólico y genético, según un análisis previo realizado por el proveedor de las muestras. Durante la formación de perlas con ambos consorcios, se notó que las correspondientes al segundo consorcio, donde se incluyó la bacteria 2MO7, presentaban una consistencia más ligosa. Esta característica podría estar relacionada con la presencia de biofilm, una estructura extracelular que algunas bacterias forman como estrategia de supervivencia y adaptación.

La especie *Pseudomonas* es reconocida por su capacidad de formar biofilms robustos. Si bien *P. aeruginosa* ha sido el modelo más estudiado en este contexto (Thi et al., 2020), otras especies del género, incluyendo aquellas presentes en ambientes naturales, también han demostrado comportamientos similares. Esta capacidad está relacionada con su habilidad para adherirse a superficies sólidas, formar comunidades multicelulares protegidas por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), y modificar su fisiología en respuesta a condiciones adversas. Es una estructura importante en el contexto de la biodegradación

y biorremediación, ya que se ha demostrado que su formación en la interfase aceite-agua potencia la eficiencia del proceso de degradación microbiana de hidrocarburos y compuestos similares en suelos contaminados, lo cual se traduce a una mejor eficiencia de degradación (Yesankar y Qureshi, 2025; H. Zhang et al., 2024). Esta mejora se atribuye a la matriz EPS, que actúa como un microambiente que protege y concentra los sustratos, facilitando el acceso de las enzimas degradativas al contaminante. Por último, el biofilm puede facilitar la cooperación metabólica entre especies, creando un sistema donde unas bacterias degraden productos intermedios generados por otras, lo cual amplifica la eficiencia del consorcio (Zubair et al., 2014).

Tomando esto en cuenta, para los consorcios lipolíticos usados en el presente estudio, se esperaba que la formación de biofilm tuviera un papel similar al favorecer la retención de lípidos en la matriz. También se esperaba que protegiera las bacterias frente a fluctuaciones de pH y temperatura. Sin embargo, los resultados no necesariamente muestran la relevancia de *P. paraglyciniae* en los consorcios, a pesar de que sí se registraron valores de absorbancia más consistentes a comparación de la alta variación observada en las pruebas con las bacterias individuales. Hay muy pocos reportes documentados sobre la capacidad de *P. paraglyciniae* de formar biofilm, lo cual limita la posibilidad de atribuir con certeza la consistencia observada a dicha estructura y plantea una brecha de conocimiento relevante para futuras investigaciones centradas en explorar su potencial degradativo, compatibilidad microbiana y sinergia funcional en ambientes contaminados. De forma similar, *B. megaterium* y *Staphylococcus sp.* han sido mencionadas solo en algunos trabajos, ya que la mayoría de los consorcios descritos en la literatura involucran especies como *B. subtilis*, *B. cereus* o *P. aureginosa*. Por ende, el presente estudio propone un enfoque innovador al incorporar cepas poco exploradas en consorcios lipolíticos, abriendo nuevas posibilidades para su aplicación en biorremediación de residuos grasos (Kawo & Faggio, 2018).

También se observó que la variabilidad en las mediciones de OD_{600} fue más pronunciada en los consorcios, lo que refleja dinámicas de interacción y supervivencia entre cepas, ya que esta es una medida de la densidad celular más que viabilidad. La comparación entre cepas individuales y consorcios en medio mínimo mostró que los consorcios alcanzaron las mayores densidades ópticas incluso a lo largo del tiempo, por lo que pueden ser más eficientes en la utilización de recursos limitados. De forma complementaria a estas observaciones, el espectro FTIR mostró que la muestra de aceite expuesta al primer consorcio en forma de extracto libre (C1L) generó una banda ancha de 3475 cm^{-1} luego de su incubación. Según un estudio realizado con aceite usado de una franquicia de alimentos, esto corresponde al estiramiento de grupos -OH provenientes de hidroperóxidos, alcoholes y ácidos grasos libres, todos productos de la degradación del aceite (Furlan et al., 2010). Aunque los resultados obtenidos en las distintas pruebas no fueron idénticos, en conjunto evidencian que las bacterias evaluadas tienen un proceso metabólico de utilización del aceite relacionado con sus lipasas extracelulares. Así, más que un aislamiento directo de las enzimas, lo que se demuestra es la funcionalidad metabólica de las bacterias bajo diferentes condiciones, lo cual constituye un criterio ampliamente aceptado para validar la capacidad degradadora de hidrocarburos y grasas en ambientes contaminados.

Contrario a lo esperado, ninguna de las pruebas donde se incluyeron perlas presentó un aumento de la estabilidad de los procesos lipolíticos, lo cual sugiere que puede no ser un método adecuado para estas bacterias y sus enzimas en particular, al menos bajo las

condiciones evaluadas. En la literatura no se ha llegado a un consenso claro acerca de la efectividad de la inmovilización en perlas de alginato. Algunos estudios, como el de Won, muestran que dicha técnica es efectiva para mejorar la estabilidad operativa de las enzimas. Sin embargo, plantea algunas especificaciones y parámetros que afectan el rendimiento de las mismas. Principalmente, determinó que una mayor concentración de alginato (entre 1 % y 2 %) aumenta la eficiencia de carga pero reduce la actividad específica de las enzimas. En el presente estudio se usó una concentración de alginato de 2.5 % con la finalidad de aumentar la retención o carga de las enzimas en las perlas, pero aún es algo muy sujeto al tamaño del poro formado y al peso molecular del sustrato que debe entrar a las perlas. En este caso no es posible conocer esto con detalle, debido a que no se saben las características específicas de las enzimas presentes en cada bacteria involucrada. Además, en el artículo se usaron lipasas derivadas de *Candida rugosa*, un hongo, por lo que el peso molecular de estas enzimas puede variar en comparación a las de las bacterias en general (Yilmaz et al., 2011). Esto destaca la necesidad de realizar una secuenciación en futuras investigaciones para conocer las características genéticas bacterianas a nivel de lipasas y asegurar que no se generen poros muy pequeños en las perlas que eviten la entrada de los sustratos específicos de las enzimas.

Asimismo, el estudio de Won resalta que un recubrimiento con quitosano o silicato mejora la estabilidad de las perlas sin necesidad de aumentar la concentración de alginato. Por ende, es más viable usar una concentración de alginato que aún permita la entrada del sustrato y completar con un recubrimiento para evitar la pérdida del mismo y así mantener la actividad lipolítica de una manera óptima. Algo similar se propuso en el estudio de Yilmaz, donde se determinó que una encapsulación de las perlas en una matriz porosa de silicato aún permite este intercambio entre la enzima y su sustrato mientras mejora incluso la estabilidad térmica (Won et al., 2005). Esto resulta relevante en aplicaciones de biorremediación, donde las fluctuaciones de temperatura en el suelo podrían comprometer la viabilidad de los sistemas enzimáticos, por lo que es una modificación para considerar a futuro. Otros estudios muestran que la efectividad de la inmovilización de enzimas puede mejorar o empeorar la actividad y estabilidad de la enzima dependiendo de las condiciones específicas usadas, ya que algunas pueden inactivarlas casi por completo (Arana-Peña et al., 2020). Por ende, el proceso de formación y uso de las perlas debe ser optimizado en función de cada contexto experimental para controlar bien cada parámetro que pueda influir en su desempeño.

A lo largo del estudio, se observó una tendencia donde las pruebas realizadas en suelo no autoclaveado mostraron valores mayores en términos de absorbancia respecto al suelo que sí se autoclaveó. Se buscaba incluir este último como un control estéril para poder atribuir los cambios observados solo a las bacterias exógenas introducidas. Por ende, se hizo una caracterización de las bacterias presentes en el suelo, las cuales incluían actinomicetos y bacilos Gram positivos para el suelo sin autoclavar. Esto es congruente con estudios que reportan la presencia de *Bacillus*, *Micrococcus* y *Streptomyces* en suelos de minas de piedra caliza, caracterizados por su pH alcalino y bajo contenido de macronutrientes (Otiniano et al., 2024).

Estas bacterias, en particular *Streptomyces*, pertenecientes a los actinomicetos, presentan un alto contenido de guanina (G) y citosina (C) en su ADN, entre 60 % y 70 %. Este contenido G+C es un factor que contribuye a su resistencia frente a condiciones extremas,

en particular la exposición a altas temperaturas (Devnarayan & Hemshikha, 2025). Sin embargo, su rango de supervivencia documentado se encuentra entre 45 °C y 60 °C, mientras que el proceso de autoclaveado al que se sometió el suelo alcanzó los 121 °C, por lo que se presume que estas bacterias fueron eliminadas. Por otro lado, el suelo que sí fue autoclaveado presentó una gran abundancia de bacilos Gram positivos. A pesar de que sí se observaron cambios en la microbiota del suelo autoclaveado, lo que indica que el ciclo aplicado fue efectivo para eliminar al menos parte de las bacterias presentes, el tratamiento con autoclave no funcionó como control de esterilización. Aún así, se observó una cantidad abundante de bacilos Gram positivos, cuya resistencia a temperaturas superiores a 100 °C en suelos ha sido ampliamente reportada. Esto se debe a su capacidad de formar endosporas, estructuras que protegen el ADN bacteriano de altas temperaturas, radiación y desecación debido a la presencia de dipicolinato de calcio y una envoltura multicapa (Mckenny et al., 2013). Por lo mismo, no se llegó a una línea base estéril para las pruebas; por ende, la inclusión del suelo autoclaveado en el estudio se justificó desde el punto de vista de un control de supresión biológica parcial que también representa un aporte para comprender la influencia de la composición fisicoquímica del suelo en los resultados.

Un estudio realizado en 2008 mostró que el tratamiento con autoclave provoca los cambios más fuertes en la estructura química de la materia orgánica del suelo (Berns et al., 2008). Se ha descrito que la absorbancia a longitudes de onda superiores a 390 nm proviene de interacciones intramoleculares de transferencia de carga entre donadores y aceptores, acumuladas a partir de distintos bloques moleculares. Dichos bloques tienen su origen en la actividad metabólica bacteriana, que genera y transforma compuestos aromáticos y polifenólicos capaces de integrarse en las sustancias húmicas. Al interactuar electrónicamente dentro de la matriz húmica, estos componentes producen estados de transferencia responsables de la señal óptica observada. Aunque la absorbancia registrada no constituye un sensor directo de la actividad metabólica en tiempo real, su origen está ligado a productos metabólicos acumulados o transformados por la acción bacteriana previa, por lo que puede considerarse una huella del metabolismo pasado o en curso (Vecchio & Blough, 2004). Sin embargo, las mediciones obtenidas no permiten identificar con certeza qué compuestos específicos absorbieron a esa longitud de onda, lo que representa un hallazgo emergente del presente estudio y abre la necesidad de investigaciones futuras. En consecuencia, surge la hipótesis de que los cambios metabólicos observados en las bacterias se orientan más que todo a rutas lipolíticas, ya que, en ausencia de lipasas extracelulares, la supervivencia de las bacterias se vería comprometida, principalmente en el medio mínimo. Esto se debe a que no habría ningún otro mecanismo disponible para que obtuvieran una fuente de carbono utilizable que pudiera acoplarse a sus rutas metabólicas convencionales. Por ende, la interpretación de los resultados se hizo considerando que estos deben entenderse como parte de un desarrollo metodológico preliminar, más que como evidencia concluyente de actividad lipasa.

Tomando en cuenta lo descrito, la interacción a nivel electrónico varía en función de los cambios en la propia matriz del suelo. El proceso de esterilización por autoclave causa un aumento drástico en el carbono orgánico disuelto (COD) debido a la lisis de los microorganismos no resistentes y la liberación de sus componentes celulares. El COD es considerado biodegradable, por lo que constituye una nueva fuente de carbono y nutrientes que puede ser aprovechada tanto por los bacilos sobrevivientes como por las bacterias introducidas de forma individual y en consorcios (Berns et al., 2008). Si bien dichas bacterias se inocularon

en un medio para aumentar su producción de lipasas, las vías lipolíticas son inducibles, por lo que existe una mayor actividad de las enzimas lipolíticas cuando el aceite es la única fuente de carbono. En contraste, cuando el COD se convierte en la fuente predominante, las bacterias priorizan su uso para asegurar su supervivencia y proliferación. Aunque esto último está ocurriendo en mayor cantidad en el suelo autoclaveado, se mide a longitudes de onda mayores que la empleada en el estudio, por lo que no se reflejó en los resultados, que se enfocan en cambios metabólicos lipolíticos.

Es importante considerar que el suelo fue expuesto a 121 °C solo por aproximadamente 10 minutos, lo que puede haber limitado la efectividad del proceso de esterilización. Estudios previos han reportado mejores resultados tras varias rondas de quince minutos en autoclave, seguidas de tratamientos de una hora que incrementaron la efectividad (Querejeta, 2023). Por ello, para aumentar la esterilidad y evitar la posible intervención de bacterias ajenas a las estudiadas, se recomienda someter el suelo a rondas más largas de autoclaveado. Otro aspecto relevante es que el suelo utilizado en este estudio no corresponde al ambiente de caña de azúcar del cual se aislaron las cepas empleadas en los consorcios, lo que implica que el método planteado debe validarse acorde a las condiciones de cada suelo en términos de biorremediación. Esto se refleja en el análisis realizado en R, donde, si bien se planteó un modelo adecuado para perfilar los datos de absorbancia obtenidos, los análisis de residuales mostraron limitaciones importantes en la capacidad explicativa de ambos modelos (Figura 19). Esto indica que, aunque los resultados obtenidos son relevantes y estadísticamente significativos dentro del marco experimental, no deben extrapolarse directamente a otras condiciones sin una validación adicional. Para ello se requieren más réplicas y la verificación de la coherencia del comportamiento observado, lo que fortalecerá la aplicabilidad de los modelos y las conclusiones. Este enfoque es consistente con recomendaciones recientes sobre la validación de modelos en microbiología ambiental, como se discute en el estudio de Thapa, donde se enfatiza la importancia de evaluar la robustez de los modelos predictivos en contextos experimentales diversos (Thapa et al., 2025).

Las absorbancias registradas se tomaron como una base para un futuro análisis a nivel metabólico con la finalidad de identificar los componentes involucrados en la respuesta lipolítica de las bacterias. Tomando en cuenta los métodos planteados y la naturaleza de la muestra usada en el estudio, es decir tierra contaminada con aceite y un inóculo bacteriano, se planteó la mejor estrategia para dicho análisis. Ya que se tiene una muestra inicial con heterogeneidad química, se debe hacer una extracción utilizando un sistema MTBE/MeOH/H₂O para separar la fracción lipídica u orgánica de la acuosa, lo que permite obtener lípidos y metabolitos polares de manera diferenciada. Para purificar y concentrar lo más posible los metabolitos a analizar, se debe hacer una extracción en fase sólida (SPE) de la muestra (Eggers & Schwudke, 2016). Esto es de especial importancia porque asegura reproducibilidad y comparabilidad de los datos, especialmente debido a que se está trabajando con posibles efectos de matriz que pueden interferir en la detección de compuestos si no se pasa por un proceso de purificación.

Posteriormente, la caracterización se plantea mediante LC-MS para el análisis de triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos de cadena media-larga, que se consideran los principales indicadores del metabolismo lipolítico. Esto se debe complementar con GC-MS para obtener un perfil más detallado de ácidos grasos en forma de ésteres metílicos y para el seguimiento de compuestos volátiles derivados de procesos oxidativos, lo cual

aporta información de la dinámica de degradación en ambientes contaminados (Y. Q. Li et al., 2023). Por último, para vincular la composición química con cambios en la comunidad microbiana, se debe hacer PFLA, con lo que también se pueden inferir adaptaciones de las bacterias frente a las condiciones creadas por el contaminante.

En la etapa de análisis bioinformático, herramientas como CANOPUS (Dührkop et al., 2020) y ChemRICH (Barupal & Fiehn, 2017) son las más viables para la clasificación y agrupación de compuestos lipídicos, incluso aquellos no anotados en bases de datos convencionales. Esto representa una ventaja frente a enfoques convencionales, que dependen de la coincidencia exacta con bibliotecas de metabolitos conocidos y por ende tienen a dejar sin interpretar una gran proporción de señales generadas en matrices ambientales complejas. Sin embargo, es importante reconocer que la calidad de los resultados depende de la resolución de los espectros obtenidos antes y de la cobertura de las bibliotecas de referencia usadas para entrenar los modelos, lo que introduce un margen de incertidumbre a considerar en la interpretación. Por último, la aplicación de enfoques de machine learning favorece al proceso al modelar las rutas de degradación a partir de los compuestos obtenidos en pruebas anteriores y así integrar la información experimental con predicciones funcionales para su aplicación en biorremediación (Quest et al., 2010).

En conjunto, aunque este estudio presenta limitaciones metodológicas —como la falta de esterilidad completa en los controles de suelo, la variabilidad observada en las mediciones de absorbancia y la necesidad de mayor caracterización genética y bioquímica de las enzimas involucradas— los resultados obtenidos son relevantes porque demuestran la capacidad de las cepas evaluadas para crecer utilizando el aceite como fuente directa de carbono y sugieren su potencial en consorcios lipolíticos para aplicaciones de biorremediación. Estas observaciones, aun siendo preliminares, aportan evidencia valiosa sobre la funcionalidad metabólica de bacterias poco exploradas y abren nuevas líneas de investigación para optimizar su uso en ambientes contaminados con residuos grasos.

- La prueba colorimétrica permitió confirmar la presencia de lipasas extracelulares en cuatro cepas bacterianas aisladas de suelo de caña de azúcar. Por ende, fueron seleccionadas para la evaluación de su capacidad lipolítica a diferentes condiciones.
- Se observó que *B.subtilis* mantiene un alto potencial de crecimiento y absorbancia a diferentes condiciones de pH y temperatura, pero con alta variabilidad. Por otro lado, *B.megaterium* y *Staphylococcus sp.* tienen valores con baja variabilidad, además de menor antagonismo hacia las demás cepas, por lo que se consideraron como las mejores opciones para la formación de consorcios. Los valores de absorbancia de las bacterias en el suelo no autoclaveado fueron mayores debido a varios factores, principalmente el cambio en las propiedades fisicoquímicas del suelo luego del tratamiento con autoclave, las cuales se deben tomar en cuenta en futuras aplicaciones.
- La formación de consorcios mantuvo su potencial de degradación pero solo bajo ciertas condiciones, lo que valida parcialmente la hipótesis planteada. Estos resultados demuestran que los consorcios bacterianos seleccionados, tomando en cuenta dinámicas microbiológicas y condiciones ambientales, pueden mejorar la eficiencia de biorremediación en suelos contaminados. Sin embargo, contrario a lo esperado, la inmovilización en perlas no mejoró esta capacidad ni en consorcios ni en cepas individuales, lo cual resalta la necesidad de estandarizar este proceso según las condiciones experimentales.
- Las mediciones de absorbancia a 405 nm constituyen un hallazgo emergente que no puede atribuirse directamente a la actividad lipasa, sino que reflejan procesos metabólicos más amplios cuya naturaleza aún no se ha esclarecido. Por ello, más que evidencia concluyente, estas mediciones deben interpretarse como un descubrimiento preliminar que aporta nuevas preguntas sobre el metabolismo bacteriano en ambientes contaminados. Este resultado abre una línea de investigación que requiere estudios adicionales para identificar los compuestos responsables de la señal óptica y su relación con la degradación de lípidos, por medio de análisis de metabolómica basados en técnicas de extracción, cromatografía y espectrometría de masas.

Recomendaciones

- En primer lugar, se recomienda realizar las mismas pruebas que involucraron el medio mínimo con p-NPP como fuente de carbono. Con ello, se podrá evaluar de forma más directa la actividad específica de las lipasas frente a un sustrato cromogénico, lo que facilitará la cuantificación espectrofotométrica y permitirá determinar la eficiencia enzimática bajo condiciones controladas. Esta modificación también contribuirá a validar la capacidad degradativa de las cepas en un contexto más representativo del mecanismo de acción lipolítica.
- Como complemento a la investigación, se recomienda confirmar la formación de biofilm por medio de una prueba con cristal violeta para cuantificar la biomasa adherida en superficies sólidas, lo que permitiría validar la capacidad de las cepas de generar matrices extracelulares y establecer comunidades multicelulares.
- Se recomienda de igual manera hacer estudios de metabolómica y química analítica de las cepas bacterianas para identificar los posibles compuestos producidos durante la degradación del aceite que pudieron causar la absorbancia observada a 405 nm. Este tipo de análisis permitiría aportar evidencia más sólida sobre los mecanismos involucrados y facilitaría la diferenciación entre productos derivados de lipasas extracelulares y otros compuestos bacterianos, contribuyendo a una interpretación más precisa de los resultados.

- Abdou, A. M. (2003). Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science*, *86*, 127-132. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73591-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73591-7)
- Abu-Khasan, M. S., & Makarov, Y. I. (2021). Analysis of soil contamination with oil and petroleum products. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *937*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/937/2/022046>
- Adlan, N. A., Sabri, S., Masomian, M., Ali, M. S. M., & Rahman, R. N. Z. R. A. (2020). Microbial Biodegradation of Paraffin Wax in Malaysian Crude Oil Mediated by Degradative Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.565608>
- Ahmad, S., Kamal, M. Z., Sankaranarayanan, R., & Rao, N. M. (2008). Thermostable *Bacillus subtilis* Lipases: In Vitro Evolution and Structural Insight. *Journal of Molecular Biology*, *381*, 324-340. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.063>
- Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., & Lee, I. J. (2023, febrero). The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020510>
- American Society for Microbiology (ASM). (2011). *A report from the American Academy of microbiology microbes & oil spills* (inf. téc.). American Society for Microbiology. www.asm.org
- Anith, K. N., Nysanth, N. S., & Natarajan, C. (2021). Novel and rapid agar plate methods for in vitro assessment of bacterial biocontrol isolates' antagonism against multiple fungal phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, *73*, 229-236. <https://doi.org/10.1111/lam.13495>

- Arana-Peña, S., Rios, N. S., Carballares, D., Mendez-Sanchez, C., Lokha, Y., Gonçalves, L. R., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Effects of Enzyme Loading and Immobilization Conditions on the Catalytic Features of Lipase From *Pseudomonas fluorescens* Immobilized on Octyl-Agarose Beads. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00036>
- Araújo, W. J., Oliveira, J. S., Araújo, S. C., Minnicelli, C. F., Silva-Portela, R. C., da Fonseca, M. M., Freitas, J. F., Silva-Barbalho, K. K., Napp, A. P., Pereira, J. E., Peralba, M. C., Passaglia, L. M., Vainstein, M. H., & Agnez-Lima, L. F. (2020). Microbial Culture in Minimal Medium With Oil Favors Enrichment of Biosurfactant Producing Genes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00962>
- Baranwal, J., Barse, B., Fais, A., Delogu, G. L., & Kumar, A. (2022, marzo). Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications. <https://doi.org/10.3390/polym14050983>
- Barupal, D. K., & Fiehn, O. (2017). Chemical Similarity Enrichment Analysis (ChemRICH) as alternative to biochemical pathway mapping for metabolomic datasets. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15231-w>
- Beal, J., Farny, N. G., & Haddock-Angelli, T. (2020). Robust estimation of bacterial cell count from optical density. *Communications Biology*, 3. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01127-5>
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C., & Verger, R. (2000). *Methods for lipase detection and assay: a critical review* (inf. téc.).
- Ben-Zeev, O., Stahnke, G., Liu, G., Davis, R. C., & Doolittle, M. H. (1994). *Lipoprotein lipase and hepatic lipase: the role of asparagine-linked glycosylation in the expression of a functional enzyme* (inf. téc.). x.
- Berns, A. E., Philipp, H., Narres, H. D., Burauel, P., Vereecken, H., & Tappe, W. (2008). Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy. *European Journal of Soil Science*, 59, 540-550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01016.x>
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G., & Komathi, S. (2019). Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. *Journal of King Saud University - Science*, 31, 898-901. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.12.018>
- Bilal, M., Asgher, M., Cheng, H., Yan, Y., & Iqbal, H. M. (2019, febrero). Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1531822>
- Cao, Z., Yan, W., Ding, M., & Yuan, Y. (2022, diciembre). Construction of microbial consortia for microbial degradation of complex compounds. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1051233>

- Carranza, L. A. S., Guerrero, M. M. H., Gaibor, M. P. A., Torres, A. F. E., & Vásquez, A. J. S. (2020). *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2020;39(4):e620 2 (inf. téc.). Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020, agosto). Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
- Cody, W. L., Wilson, J. W., Hendrixson, D. R., McIver, K. S., Hagman, K. E., Ott, C. M., Nickerson, C. A., & Schurr, M. J. (2008). Skim milk enhances the preservation of thawed - 80 °C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*, 75, 135-138. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.006>
- Creencia, A. R., Mendoza, B. C., Migo, V. P., & Monsalud, R. G. (2014). *Degradation of Residual Jatropha Oil by a Promising Lipase-Producing Bacterial Consortium* (inf. téc.). x. <http://www.senate.gov.ph/>
- Devnarayan, P., & Hemshikha, S. (2025). International Journal of Current Science Research and Review Isolation and Morphological Characterization of Actinomycetes from Industrial Soils and Analysis of Their Biodiversity. *International Journal of Current Science Research and Review*. <https://doi.org/10.47191/ijcsrr/V8-i7-67>
- Dührkop, K., Nothias, L. F., Fleischauer, M., Ludwig, M., Hoffmann, M. A., Rousu, J., Dorrestein, P. C., & Böcker, S. (2020, abril). Classes for the masses: Systematic classification of unknowns using fragmentation spectra. <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.046672>
- Ebadi, A., Ghavidel, A., Khoshkholgh, N., Heydari, G., & Ghaffari, M. (2021). New strategy to increase oil biodegradation efficiency by selecting isolates with diverse functionality and no antagonistic interactions for bacterial consortia. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9.
- Eggers, L. F., & Schwudke, D. (2016). Lipid Extraction: Basics of the Methyl-tert-Butyl Ether Extraction. En *Encyclopedia of Lipidomics* (pp. 1-3). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_96-1
- Furlan, P. Y., Wetzel, P., Johnson, S., Wedin, J., & Och, A. (2010). Investigating the oxidation of biodiesel from used vegetable oil by FTIR spectroscopy: Used vegetable oil biodiesel oxidation study by FTIR. *Spectroscopy Letters*, 43, 580-585. <https://doi.org/10.1080/00387010.2010.510708>
- Guerrand, D. (2017). Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. *OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 24. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017031>
- Gururaj, P., Ramalingam, S., Devi, G. N., & Gautam, P. (2016). Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter* sp. AU07. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 647-657. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.04.002>

- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*, 235-251. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2009, noviembre). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.001>
- Hu, J., Cai, W., Wang, C., Du, X., Lin, J., & Cai, J. (2018). Purification and characterization of alkaline lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* HFE733 and application for biodegradation in food wastewater treatment. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *32*, 583-590. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1446764>
- Hussain. (2023). Lipases: Sources, immobilization techniques, and applications. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, *8*, 094-121. <https://doi.org/10.22161/ijeab.86.12>
- Ji, Q., Xiao, S., He, B., & Liu, X. (2010). Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *66*, 264-269. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.06.001>
- Kanmani, P., Aravind, J., & Kumaresan, K. (2015, marzo). An insight into microbial lipases and their environmental facet. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0605-0>
- Kawasaki, K., Kondo, H., Suzuki, M., Ohgiya, S., & Tsuda, S. (2002). Crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase at 1.3Å resolution.
- Kawo, A., & Faggo, A. (2018). Enhanced removal of crude oil in soil by co-culture of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contaminated soil in Kano State, Nigeria. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, *10*, 423. <https://doi.org/10.4314/bajopas.v10i1.83s>
- Knezevic, Z., Milosavic, N., Bezbradica, D., Jakovljevic, Z., & Prodanovic, R. (2006). Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. *Biochemical Engineering Journal*, *30*, 269-278. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.05.009>
- Kourist, R., Schmidt, S., Khan, F. I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., & Wang, Y. (2017). The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. *Frontiers*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>
- Lajis, A. F. B. (2018). Realm of Thermoalkaline Lipases in Bioprocess Commodities. *Journal of Lipids*, *2018*, 1-22. <https://doi.org/10.1155/2018/5659683>
- Lawson, C. E., Harcombe, W. R., Hatzenpichler, R., Lindemann, S. R., Löffler, F. E., O'Malley, M. A., Martín, H. G., Pflieger, B. F., Raskin, L., Venturelli, O. S., Weissbrodt, D. G., Noguera, D. R., & McMahon, K. D. (2019, diciembre). Common principles and best practices for engineering microbiomes. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0255-9>

- Lee, L. P., Karbul, H. M., Citartan, M., Gopinath, S. C., Lakshmi Priya, T., & Tang, T. H. (2015). Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: Promising strains to alleviate oil pollution. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/820575>
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (1970). *Principios de Bioquímica* (1.^a ed.).
- Li, J., Li, J., Yang, R., Yang, P., Fu, H., Yang, Y., & Liu, C. (2024). Construction of Microbial Consortium to Enhance Cellulose Degradation in Corn Straw during Composting. *Agronomy*, 14. <https://doi.org/10.3390/agronomy14092107>
- Li, Y. Q., Xin, Y., Li, C., Liu, J., & Huang, T. (2023). Metagenomics-metabolomics analysis of microbial function and metabolism in petroleum-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54, 935-947. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01000-7>
- Liu, Y. F., Galzerani, D. D., Mbadanga, S. M., Zaramela, L. S., Gu, J. D., Mu, B. Z., & Zengler, K. (2018). Metabolic capability and in situ activity of microorganisms in an oil reservoir. *Microbiome*, 6. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0392-1>
- Louis, J., & Jaeger, K.-E. (1999). *Bacterial lipolytic enzymes : classification and properties* (inf. téc.). x. www.ncbi.nlm.
- Lu, H., Villada, J. C., & Lee, P. K. (2019, febrero). Modular Metabolic Engineering for Biobased Chemical Production. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.003>
- Lu, Y., Pang, Z., & Xia, J. (2023, enero). Comprehensive investigation of pathway enrichment methods for functional interpretation of LC-MS global metabolomics data. <https://doi.org/10.1093/bib/bbac553>
- Madan, B., & Mishra, P. (2014). Directed evolution of *Bacillus licheniformis* lipase for improvement of thermostability. *Biochemical Engineering Journal*, 91, 276-282. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.08.022>
- Majumder, D., Dey, A., Ray, S., Bhattacharya, D., Nag, M., & Lahiri, D. (2024). Use of genomics & proteomics in studying lipase producing microorganisms & its application. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2024.100218>
- Mckenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013, enero). The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Mekkiyah, H. M., Al-Hamadani, Y. A., Abdulhameed, A. A., Resheq, A. S., & Mohammed, Z. B. (2023). Effect of Crude Oil on the Geotechnical Properties of Various Soils and the Developed Remediation Methods. *Applied Sciences (Switzerland)*, 13. <https://doi.org/10.3390/app13169103>
- Minnikova, T., Kolesnikov, S., Revina, S., Ruseva, A., & Gaivoronsky, V. (2023). Enzymatic Assessment of the State of Oil-Contaminated Soils in the South of Russia after Bioremediation. *Toxics*, 11. <https://doi.org/10.3390/toxics11040355>

- Mougi, A. (2024). pH Adaptation stabilizes bacterial communities. *NPJ Biodiversity*, 3. <https://doi.org/10.1038/s44185-024-00063-5>
- Nanekar, R. D., & Kokitkar, S. S. (2024). Enzyme Profiling of Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated from Oil Contaminated Soils. *Indian Journal Of Science And Technology*, 17, 2412-2420. <https://doi.org/10.17485/IJST/v17i23.642>
- National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). (s.f.). *STEM ACTIVITY Joint Polar Satellite System Satellites and Soil* (inf. téc.). <http://www.nesdis.noaa.gov/about/k-12->
- Navarro-González, I., & Periago, M. (2012). Caracterización, clasificación y usos de las enzimas lipasas en la producción industrial. *Propiedades*, 28, 45-65.
- Otiniano, N. M., Farfán-Córdova, M., Cabeza, J. G., & Cabanillas-Chirinos, L. (2024). Isolation and selection of spore-forming bacilli with potential for self-healing of concrete. *Scientific Reports*, 14. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77241-9>
- Pham, V. H. T., Kim, J., Chang, S., & Chung, W. (2021). Investigation of lipolytic-secreting bacteria from an artificially polluted soil using a modified culture method and optimization of their lipase production. *Microorganisms*, 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122590>
- Phulpoto, I. A., Yu, Z., Hu, B., Wang, Y., Ndayisenga, F., Li, J., Liang, H., & Qazi, M. A. (2020). Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and its potential for oil contaminated soil remediation. *Microbial Cell Factories*, 19. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01402-4>
- Pohanka, M. (2019, febrero). Biosensors and bioassays based on lipases, principles and applications, a review. <https://doi.org/10.3390/molecules24030616>
- Prashanthi, R., Shreevatsa, G. K., Krupalini, S., & Manoj, L. (2021). Isolation, characterization, and molecular identification of soil bacteria showing antibacterial activity against human pathogenic bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00219-x>
- Querejeta, G. A. (2023). Sterilize Methods Comparison for Soils: Cost, Time, and Efficiency. *International Journal of Methodology*, 2, 34-40. <https://doi.org/10.21467/ijm.2.1.6263>
- Quest, D. J., Land, M. L., Brettin, T. S., & Cottingham, R. W. (2010). Next generation models for storage and representation of microbial biological annotation. *BMC Bioinformatics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-15>
- Ramnath, L., Sithole, B., & Govinden, R. (2017). Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. *Biotechnology Reports*, 15, 114-124. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.07.004>

- Rodríguez, J. (2023). *Análisis de la generación de desechos sólidos en Guatemala* (inf. téc.).
- Rojo, F. (2019). *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids* (1.^a ed.). Springer.
- Sáez-Navarrete, C. A., & Cáceres-Zambrano, J. Z. (2025). Tolerance and Metabolization of High-Concentration Heavy Crude Oil High-Concentration Heavy Crude Oil by *Bacillus subtilis*. *Microorganisms*, *13*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13071520>
- Sahoo, R. K., Sanket, A. S., Gaur, M., Das, A., & Subudhi, E. (2019). Insight into the structural configuration of metagenomically derived lipase from diverse extreme environment. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *22*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101404>
- Seidman, J. G. (2010, abril). Construction of recombinant DNA libraries: Introduction. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0500s64>
- Sikora, A., Siódmiak, T., & Marszał, M. P. (2014, octubre). Kinetic resolution of profens by enantioselective esterification catalyzed by *Candida antarctica* and *Candida rugosa* lipases. <https://doi.org/10.1002/chir.22362>
- Sokalingam, S., Raghunathan, G., Soundrarajan, N., & Lee, S. G. (2012). A study on the effect of surface lysine to arginine mutagenesis on protein stability and structure using green fluorescent protein. *PLoS ONE*, *7*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040410>
- Sun, Z., Liu, T., Liu, Z., Zeng, C., & Liu, Z. (2022). Screening of antagonistic bacteria against the blue mold of citrus fruit from soil by a new parallel screening method without prior isolation of single strains. *Biological Control*, *176*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105066>
- Thapa, A., Pahari, S., Timilsina, S., & Chapagain, B. (2025, mayo). Dharma: A novel machine learning framework for pediatric appendicitis—diagnosis, severity assessment and evidence-based clinical decision support. <https://doi.org/10.1101/2025.05.27.25328468>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. (2020, noviembre). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Tyndall, J. D., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, L. A., Taylor, P., & Walkinshaw, M. D. (2002). Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *Journal of Molecular Biology*, *323*, 859-869. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01004-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01004-5)
- Vecchio, R. D., & Blough, N. V. (2004). On the origin of the optical properties of humic substances. *Environmental Science and Technology*, *38*, 3885-3891. <https://doi.org/10.1021/es049912h>

- Wang, C., Li, Y., Tan, H., Zhang, A., Xie, Y., Wu, B., & Xu, H. (2019). A novel microbe consortium, nano-visible light photocatalyst and microcapsule system to degrade PAHs. *Chemical Engineering Journal*, *359*, 1065-1074. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.077>
- Won, K., Kim, S., Kim, K. J., Park, H. W., & Moon, S. J. (2005). Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochemistry*, *40*, 2149-2154. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.014>
- Yesankar, P. J., & Qureshi, A. (2025). Insights into the functionality of biofilm-forming bacterial consortia as bioavailability enhancers towards biodegradation of pyrene in hydrocarbon-contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, *375*, 124295. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2025.124295>
- Yilmaz, E., Can, K., Sezgin, M., & Yilmaz, M. (2011). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester. *Bioresource Technology*, *102*, 499-506. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.083>
- Zhang, H., Zhang, W., Zong, Y., Kong, D., Ma, L., Wu, X.-L., & Zhao, K. (2024). Dynamics of microbial-induced oil degradation at the microscale. *Microbiology Spectrum*, *12*. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01176-24>
- Zhang, W., Lu, J., Zhang, S., Liu, L., Pang, X., & Lv, J. (2018). Development an effective system to expression recombinant protein in *E. coli* via comparison and optimization of signal peptides: Expression of *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 thermostable lipase as case study. *Microbial Cell Factories*, *17*. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0894-y>
- Zubair, M., Ashraf, M., Arshad, M., Raza, A., Mustafa, B., & Ahsan, A. (2014). *Formation and Significance of Bacterial Biofilms* (inf. téc.). University of Agriculture. <http://www.ijcmas.com>

13.1. Anexo A. Caracterización de bacterias del suelo

Cuadro 8. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias en el suelo no autoclaveado

Muestra	Características macroscópicas	Características microscópicas
C-	Colonias con morfología mucosa y brillante, con bordes regulares y coloración ligeramente amarilla. Colonias con crecimiento abundante y aspecto viscoso.	Bacilos Gram positivos ligeramente alargados individuales sin esporas. Disposición dispersa sin agrupamientos definidos.
C1	Colonias pequeñas aisladas con coloración blanca y brillante y bordes blancos. Colonias con crecimiento limitado y bordes definidos.	Bacilos Gram positivos filamentosos escasos sin esporas. Disposición irregular con baja densidad celular.
C2	Colonias pequeñas aisladas con coloración blanca y brillante y bordes blancos. Colonias con aspecto seco y crecimiento puntual.	Bacilos Gram positivos filamentosos escasos sin esporas. Bacilos dispersos con morfología uniforme.
C3	Colonias con morfología mucosa y brillante, con bordes ondulados y coloración ligeramente amarilla.	Bacilos filamentosos cortos escasos sin esporas.

Nota. Elaboración propia.

Cuadro 9. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias en el suelo autoclaveado

Muestra	Características macroscópicas	Características microscópicas
C-	Colonias blancas aisladas, con morfología mucosa y brillante y bordes lisos.	
C1	Colonias blancas mucosas no aisladas escasas.	Bacilos Gram positivos pequeños y abundantes, sin esporas.
C2	Colonias blancas mucosas no aisladas escasas.	
C3	Colonias blancas aisladas, con morfología mucosa y brillante y bordes lisos.	

Nota. Elaboración propia.

13.2. Anexo B. Factor de conversión a UFC calculado por cepa

Cuadro 10. Conteo de UFC en medio mínimo para las cepas bacterianas

Bacteria	UFC/mL (10^8)	Factor de conversión
<i>B. subtilis</i>	30	1.08×10^{10}
<i>B. cereus</i>	1.23	3.25×10^8
<i>Staphylococcus sp.</i>	15	4.09×10^9
<i>B. megaterium</i>	1.9	4.92×10^8

Nota. Elaboración propia.

13.3. Anexo C. Selección de modelos para la representación de los datos de absorbancia

Cuadro 11. Comparación de modelos planteados para la absorbancia observada

Modelo planteado	LL	AICc	Δ AICc	ω AICc
Suelo no autoclaveado				
ln(Absorbancia) ~ Temperatura + pH + Bacteria	276.25	-538.4	0	1
log(Absorbancia) ~ Temperatura + pH + Bacteria	-975.80	1965.7	2504.1	0
Suelo autoclaveado				
ln(Absorbancia) ~ Temperatura + pH + Bacteria	903.342	-1792.6	0	1
log(Absorbancia) ~ Temperatura + pH + Bacteria	55.526	-96.9	1695.63	0

Nota. Elaboración propia.

13.4. Anexo D. Controles de las pruebas realizadas

Cuadro 12. Controles de los valores de OD600 y UFC/mL para las cepas bacterianas bajo diferentes condiciones de pH y temperatura

Bacteria	pH	Temperatura (°C)	OD600	UFC/mL
<i>B. subtilis</i>	6	25	0.027	7.50×10^9
	6	35	0.042	1.17×10^{10}
	6	45	0.018	5.00×10^9
	7	25	0.018	5.00×10^9
	7	35	0.013	3.61×10^9
	7	45	0.039	1.08×10^{10}
	8	25	0.027	7.50×10^9
	8	35	0.028	7.78×10^{10}
	8	45	0.054	1.50×10^{10}
<i>B. cereus</i>	6	25	0.15	4.40×10^9
	6	35	0.043	1.26×10^9
	6	45	0.129	3.79×10^9
	7	25	0.205	6.02×10^9
	7	35	0.017	4.99×10^8
	7	45	0.099	2.91×10^9
	8	25	0.017	4.99×10^8
	8	35	0.212	6.23×10^9
	8	45	0.088	2.58×10^9
<i>Staphylococcus sp.</i>	6	25	0.047	2.54×10^9
	6	35	0.194	1.05×10^{10}
	6	45	0.062	3.35×10^9
	7	25	0.068	3.67×10^9
	7	35	0.077	4.16×10^9
	7	45	0.128	6.91×10^9
	8	25	0.048	2.59×10^9
	8	35	0.023	1.24×10^9
	8	45	0.631	3.41×10^{10}
<i>B. megaterium</i>	6	25	0.016	1.94×10^8
	6	35	0.302	3.65×10^9
	6	45	0.022	2.66×10^8
	7	25	0.243	2.94×10^9
	7	35	0.148	1.74×10^9
	7	45	0.012	1.45×10^8
	8	25	0.012	1.45×10^8
	8	35	0.024	2.90×10^8
	8	45	0.154	1.86×10^9

Nota. Elaboración propia.

Cuadro 13. Controles de los valores de absorbancia para los consorcios bajo distintas condiciones de pH y temperatura

Consortio	pH	Temperatura (°C)	Absorbancia
C1	6	25	0.196
	6	35	0.09
	6	45	0.059
	7	25	0.223
	7	35	0.248
	7	45	0.027
	8	25	0.216
	8	35	0.185
	8	45	0.046
C2	6	25	0.091
	6	35	0.072
	6	45	0.157
	7	25	0.103
	7	35	0.079
	7	45	0.011
	8	25	0.156
	8	35	0.07
	8	45	0.089

Nota. Elaboración propia.

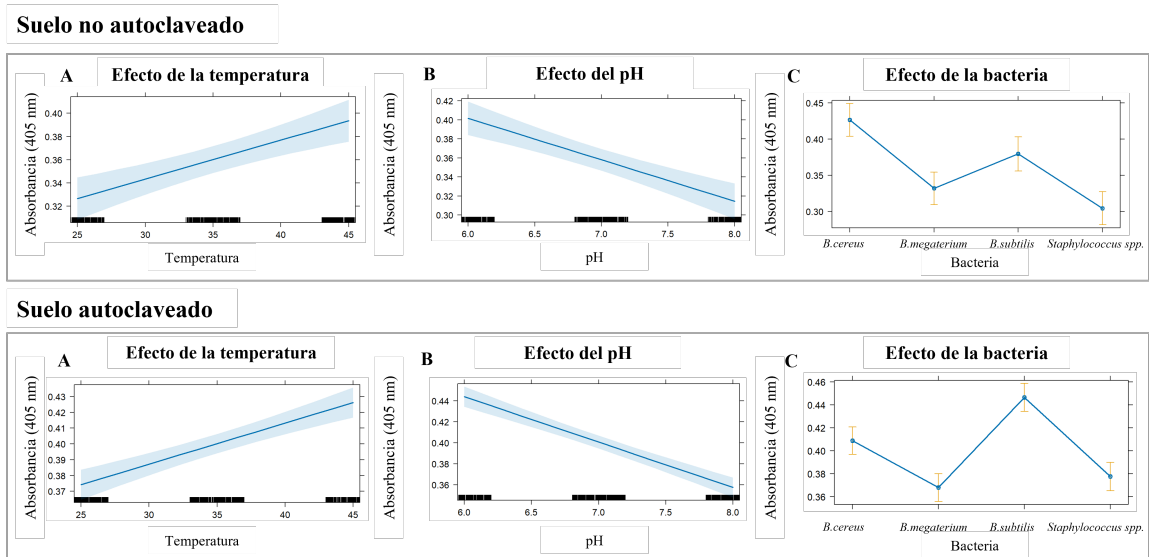
Cuadro 14. Controles de los datos de absorbancia de las cepas individuales bajo distintas condiciones de pH y temperatura

Tratamiento	pH	Temperatura (°C)	Promedio absorbancia (\bar{x})
No autoclaveado	6	25	0.549
	6	35	0.619
	6	45	0.436
	7	25	0.335
	7	35	0.334
	7	45	0.353
	8	25	0.336
	8	35	0.528
	8	45	0.520
Autoclaveado	6	25	0.270
	6	35	0.325
	6	45	0.318
	7	25	0.306
	7	35	0.321
	7	45	0.251
	8	25	0.315
	8	35	0.448
	8	45	0.425

Nota. Elaboración propia.

13.5. Anexo E. Efecto de las variables en la absorbancia según los modelos seleccionados

Figura 18. Efectos de la temperatura, el pH y la bacteria en la absorbancia

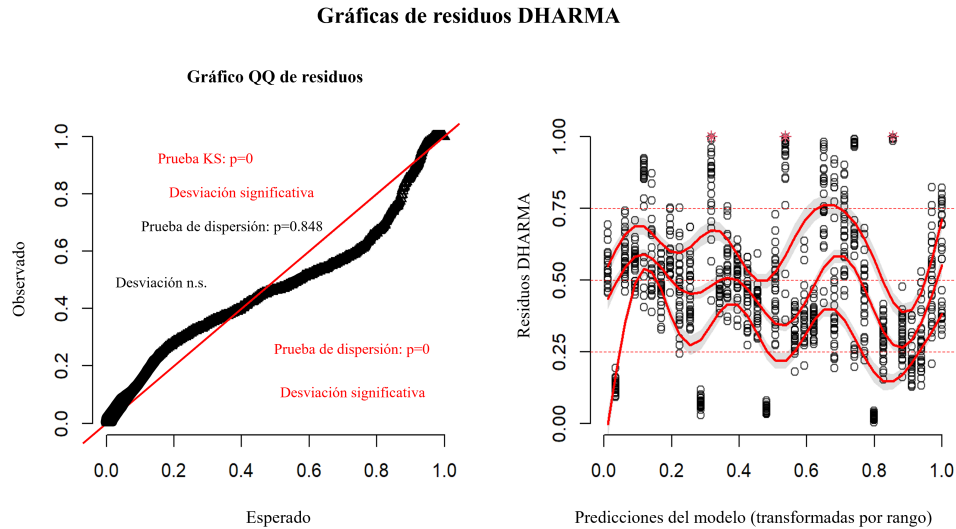


Nota. En ambos casos, se observa una correlación positiva entre la temperatura y la absorbancia, lo que sugiere que el aumento térmico favorece la actividad enzimática. Sin embargo, el efecto del pH es inverso: a medida que el pH se incrementa, la absorbancia disminuye, indicando una posible pérdida de eficiencia en condiciones más alcalinas. En cuanto al tipo de bacteria, se evidencian diferencias claras entre especies, siendo *B. subtilis* y *Staphylococcus spp.* las que generan mayores niveles de absorbancia en suelo autoclaveado, mientras que en suelo no autoclaveado las respuestas son más heterogéneas. Elaboración propia en RStudio.

13.6. Anexo F. Validación de modelos seleccionados

13.6.1. Suelo no autoclaveado

Figura 19. Validación de residuales para el modelo lineal de la absorbancia en suelo no autoclaveado

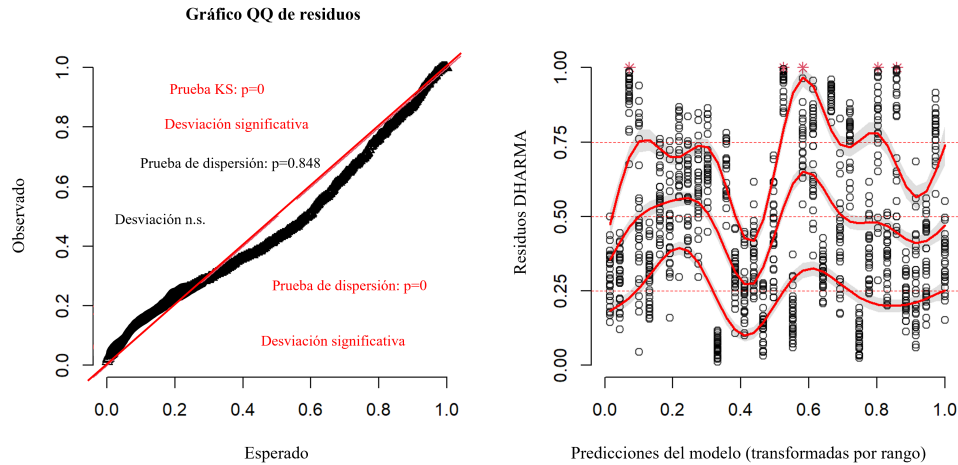


Nota. En el gráfico QQ, la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p = 0$) indica una desviación significativa entre los residuos observados y los esperados, lo que sugiere que los residuos no siguen una distribución uniforme ideal. Aunque una de las pruebas de dispersión no muestra significancia ($p = 0.848$), otra sí lo hace ($p = 0$), lo que apunta a posibles inconsistencias en la varianza de los residuos. Por otro lado, el gráfico de residuos frente a predicciones transformadas por rango muestra patrones no aleatorios y presencia de valores atípicos, lo que refuerza la posibilidad de especificación incorrecta del modelo o de efectos no capturados. En conjunto, estos resultados sugieren que el modelo requiere ajustes adicionales para mejorar su capacidad explicativa y cumplir con los supuestos de homogeneidad y distribución de residuos. Elaboración propia en RStudio.

13.6.2. Suelo autoclaveado

Figura 20. Validación de residuales para el modelo lineal de la absorbancia en suelo autoclaveado

Gráficas de residuos DHARMA



Nota. El gráfico QQ muestra una desviación significativa entre los residuos observados y los esperados ($p = 0$ en la prueba KS), lo que indica que los residuos no siguen una distribución uniforme ideal. Aunque una de las pruebas de dispersión no fue significativa ($p = 0.848$), otra sí lo fue ($p = 0$), lo que sugiere posibles problemas de heterogeneidad en la varianza. Por su parte, el gráfico de residuos frente a predicciones transformadas por rango revela patrones no aleatorios y presencia de valores atípicos, por lo que hay posibilidad de especificación incorrecta o de efectos no modelados. En conjunto, estas evidencias muestran la necesidad de revisar la estructura del modelo para mejorar su ajuste y cumplir con los supuestos de independencia y homogeneidad de los residuos. Elaboración propia en RStudio.