

**MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR LAS GRASAS Y
ACEITES VEGETALES PRESENTES EN EL EFLUENTE DEL PROCESO DE
REFINACIÓN DE ACEITES DE C.I. SACEITES S.A.**

BAYRON ENRRIQUE AGUALIMPIA VALDERRAMA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRIA EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2013

**MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR LAS GRASAS Y
ACEITES VEGETALES PRESENTES EN EL EFLUENTE DEL PROCESO DE
REFINACIÓN DE ACEITES DE C.I. SACEITES S.A.**

BAYRON ENRRIQUE AGUALIMPIA VALDERRAMA

**Trabajo de aplicación realizada como requisito para optar el título de
MAESTRÍA EN QUÍMICA AMBIENTAL**

Directores:

Dra. JANETH AIDE PEREA VILLAMIL

MSc. VICENTE OTERO MURIEL

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

MAESTRIA EN QUÍMICA AMBIENTAL

BUCARAMANGA

2013

DEDICATORIA

A mi madre quien en todos los instantes de mi vida ha sido el pilara que me da fuerza, apoyo, orientación, seguridad y certeza; me da seguridad para creer que todo es posible. Ella es el ejemplo de vida que sigo, la luz que orienta, el amparo que protege, el cimiento de mis sueños, la fuente de mis virtudes. Ella lo es todo para mí, este logro es producto de lo que ella ha hecho y hace de mí, lo que me ha formado, lo que me ha impartido. Soy su legado, su hijo, su hermano, su amigo, su más firme seguidor.

A la memoria de mi padre y hermano; fueron ello grande seres, ejemplo de vida, hombres de gran integridad moral. Hoy se constituyen en guadianés del legado, en pasado, presente y futuro. Se merecen este logro y todos mis recuerdos, mi admiración, mis plegarias y oraciones.

A mi esposa, luz de cada día, fuerza ante las adversidades, complemento de mí ser, el amor de mi vida. Caminamos juntos, luchamos juntos, alcanzamos los logros juntos. Ella tiene la fuerza que me da el impulso para seguir, se aconseja y me da seguridad, es mi equilibrio perfecto.

AGRADECIMIENTOS

A nuestro señor Jesucristo, único y amado Dios, él hace que todo sea posible, da la razón, la bendición, las herramientas, la fuerza, la sabiduría, la inteligencia; es el, quien colocó en mi camino, los valiosos seres humanos que contribuyeron para que este logro fuera posible; a él y ellos todo mi agradecimiento.

A Miryam Valderrama Mosquera, mi madre por su apoyo sin límites, sin distancia; por todo lo material y espiritual brindado; por su compromiso y creer que tengo las capacidades; por tener fe en mí. Por hacer tuyas mis meta, sueños y proyectos.

A Cecilia Galvis Bautista, mi esposa, por todo su apoyo y compañía; por su participación activa en todo este proceso y por sus valiosos aportes. Ella sigue siendo el complemento perfecto y participe activa de mis triunfos, con sus consejos y propuestas éste trabajo cobro mayor relevancia.

A Vicente Ótero Muriel, director del proyecto por la UDES, por su apoyo y aportes al desarrollado éste trabajo y demás proyectos. Durante años, ha representado un elemento fundamental en los triunfos alcanzado, es un amigo, compañero y ejemplo a seguir.

Janeth Aide Perea Villamil, director del proyecto por la UIS, por su enorme colaboración y compromisos, todos sus aportes dieron altura y peso a la investigación, se constituyó en elemento fundamental para lograr los objetivos trazados.

A Clara Inés Sánchez Suárez y Nelson Moreno Safra, mis evaluadores, por sus grandes aportes y recomendaciones al desarrollo del proyecto, fueron fundamentales para darle mayor calidad al trabajo realizado.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION	17
2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	22
2.1 GRASAS Y ACEITES VEGETALES COMESTIBLES	22
2.1.1 Plantas Oleaginosas	22
2.1.2 Oleaginosas en Colombia	24
2.2 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS AVC	25
2.2.1 Extracción	25
2.2.2 Refinación	26
2.3 COMPOSICIÓN DE ACEITES	28
2.4 RESIDUOS Y CONTAMINACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y REFINACIÓN	29
2.4.1 Residuos del Cultivo y Producción	29
2.4.2 Residuos de la Extracción	30
2.4.3 Residuos de la Refinación	30
2.4.4 Residuos de la Producción de Aceites en Colombia	32
2.5 TRATAMIENTOS FÍSICOS, QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS	33
2.5.1 Tratamientos Físicos	33
2.5.2 Tratamientos Químicos	34
2.5.3 Tratamientos Biológicos	34
2.6 BIODEGRADACIÓN DE GRASAS Y ACEITES	35
2.6.1 Lipasas de Origen Microbiano	36
2.6.2 Biodegradación Grasas y Aceites	37
3. METODOLOGÍA	39
3.1 TIPO DE ESTUDIO	39

3.2 MUESTREO	39
3.3 AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS Y LEVADURAS CON POTENCIAL DEGRADADOR	39
3.3.1. Preenriquecimiento no Selectivo	40
3.3.2. Adaptación de Microorganismos	40
3.3.3. Aislamiento Selectivo	40
3.3.4 Selección de Microorganismos con Potencial Degradador	41
3.4 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS CON MAYOR CAPACIDAD DEGRADADORA	41
3.5 DESARROLLO DEL INÓCULO MIXTO	42
3.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEGRADADORA A PEQUEÑA ESCALA	43
3.7 CURVA DE CRECIMIENTO: DENSIDAD ÓPTICA VS UFC	43
3.8 MEDIO BASAL DE SALES MODIFICADO (MBSMF)	44
3.9 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1 AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS Y LEVADURAS CON POTENCIAL DEGRADADOR.	50
4.1.1 Aislamiento Selectivo de Bacteria y Levaduras	50
4.1.2 Selección de Bacterias y Levaduras con Potencial Degradador	54
4.2 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS CON MAYOR CAPACIDAD DEGRADADORA	59
4.3 DESARROLLO DEL INOCULO MIXTO	65
4.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEGRADADORA A PEQUEÑA ESCALA	67
5. CONCLUSIONES	70
6. RECOMENDACIONES	71

7. BIBLIOGRAFÍA	72
8. ANEXOS	78

LISTA DE TABLA

	Pág.
Tabla 1. Producción mundial de aceites y grasas 2002-2008 (Miles de Toneladas).	24
Tabla 2. Contenido de ácidos grasos de diferentes derivados oleaginosos.	28
Tabla 3. Características físico-químicas de los efluentes generados en el procesamiento de aceite de palma en Malasia (POME).	31
Tabla 4. Resultados de los análisis fisicoquímicos realizados a las muestras utilizadas para el aislamiento de los microorganismos	48
Tabla 5. Número de Aislamientos de Bacterias y Levaduras, obtenidos en los medios modificados, a partir de las muestras utilizadas.	53
Tabla 6. Características microscópicas y macroscópicas de los aislamientos con potencial degradador de grasas y aceites de origen vegetal.	56
Tabla 7. Análisis de varianza de los efectos principales: Aislamiento-Tiempo y su interacción son sobre degradación de las grasas y aceites ($p < 0,05$).	62
Tabla 8. Pruebas de comparaciones múltiples	64
Tabla 9. Efecto del Mix7 sobre los parámetros del agua residual y el control.	68

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Muestras para el aislamiento de microorganismos con capacidad para la degradación de grasas y aceites vegetales.	47
Figura 2. Evolución del crecimiento de los microorganismos durante la fase de preenriquecimiento y adaptación.	51
Figura 3. Crecimiento de microorganismos en el medio basal de sales, a partir de las suspensiones de adaptación.	52
Figura 4. Evidencia del crecimiento de los Aislamientos con potencial degradador.	55
Figura 5. Porcentajes de disminución de la concentración de grasas y aceites (DQO) logrados por los 11 aislamientos, a las 48 y 72 hora de evaluación	61
Figura 6. Porcentaje de disminución de la concentración de grasas y aceites medido en términos de (DQO) alcanzado por las 7 mezclas durante 48 horas de evaluación.	66
Figura 7. Montaje piloto para evaluar la capacidad degradadora del Mix 7 a escala de 4l durante 48 horas, a $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$.	67
Figura 8. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL01 durante 36 hora de medición.	78
Figura 9. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACB02 durante 24 hora de medición.	79
Figura 10. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL03 durante 36 hora de medición.	79
Figura 11. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL04 durante 36 hora de medición.	80
Figura 12. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL05 durante 36 hora de medición.	80

Figura 13. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL06 durante 36 hora de medición.	81
Figura 14. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACB07 durante 24 hora de medición.	81
Figura 15. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL08 durante 36 hora de medición.	82
Figura 16. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL09 durante 36 hora de medición.	82
Figura 17. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACB10 durante 24 hora de medición.	83
Figura 18. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL11 durante 36 hora de medición.	83
Figura 19. Residuos generados en las etapas del proceso de refinación química de aceite de palma	84

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A: CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS 11 AISLAMIENTOS CON POTENCIAL DEGRADADOR	78
Anexo B: ETAPAS Y RESIDUOS DEL PROCESOS DE REFINACIÓN DE ACEITE DE PALMA	84

RESUMEN

TITULO: MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR LAS GRASAS Y ACEITES VEGETALES PRESENTES EN EL EFLUENTE DEL PROCESO DE REFINACIÓN DE ACEITES DE C.I. SACEITES S.A*

AUTOR: Bayron Agualimpia Valderrama**

PALABRAS CLAVES: Biodegradación, Lipolíticos, Residuos, Aislamientos, DQO, Grasas y aceites

DESCRIPCION:

En el presente trabajo se evaluó la obtención de microorganismos con capacidad degradadora de grasas y aceites de origen vegetal, aislados del agua residual y residuos aceitosos sólidos de la Trampa de Grasas de "C.I. SANTANDEREANA DE ACEITES S.A. Para ello inicialmente se aislaron 31 morfotipos; 14 de estos a partir de agua residual y 17 a partir de residuos aceitosos sólidos, con capacidad para crecer en medio modificado con aceite de palma y soya como única fuente de carbono. Posteriormente mediante una prueba de verificación se encontró que de los 31 aislamientos, solo 11 tuvieron potencial para la degradación de las grasas y aceites de origen vegetal, 8 levaduras de los géneros *Yarrowia* y *Candida*, los 3 restantes fueron bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. Posteriormente, en medio sintético y con la adición de aceite de palma y soya (2000 mg/l), se evaluó de forma indirecta la capacidad degradadora de los 11 Aislamientos, determinando la disminución de la concentración de DQO a las 48 y 72 horas de degradación, se encontró que los aislamientos SACL01, SACL05, SACL08, SACL09, SACB10 y SACL 11 fueron los de mayor capacidad degradadora, logrando a las 48 horas de degradación una disminución de la concentración de DQO entre el 50%, 62% y a las 72 horas entre 66% a 79%. Los aislamientos SAC SACB 02, SACL04, SACL07 fueron los de menor capacidad degradadora. Finalmente con los 6 aislamientos de mayor capacidad degradadora se conformó un inóculo mixto (Mix7) con el cual se alcanzó a las 48 horas de degradación una disminución de la concentración de DQO del orden del 84% en el medio sintético y una disminución del orden del 72 al 75% al emplear agua residual del efluente del proceso de refinación de aceites de C.I. SACEITES S.A.

* Proyecto de grado.

** Facultad de ciencia. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander, Directores: Dra. Janeth Aide Perea Villamil, Msc. José Vicente Otero Muriel.

ABSTRACT

TITLE: MICROORGANISMS CAPABLE OF DEGRADING VEGETABLE FATS AND OILS PRESENT IN THE EFFLUENT PROCESS OIL REFINING OF C.I. SACEITES S.A*

AUTHOR: Bayron Agualimpia Valderrama**

KEYWORDS: Biodegradation, lipolytic, Waste, Isolations COD, Fats and oils

SUMMARY:

The present proposal set out the extraction of microorganisms with deterioration abilities of edible vegetable fats and oils origin isolated from sewage and solid oily residues of the effluents (fat traps) of C.I. SANTANDEREANA DE ACEITES), so 31 characterized morphotypes. 14 of these from sewage and 17 from solid oily residues, capable of growing in modified means with palm and soybean oil as the only source of carbon. Then, some verification tests of the ability in basal means of salts, with of oil, finding out that only 11 isolations showed potential to degrade fats and oil of vegetable origin of all the 31 isolations. 8 of them yeasts belonging to the genus *Yarrowia* y *Candida* and 3 of them bacteria belonging to genus *Bacillus* and *Pseudomonas*. Subsequently using a synthetic way and oil addition palm and soybead (2000 mg/l), it is tested the deterioration abilities, origins of the 11 isolations. The isolations SACL01, SACL05, SACL08, SACL09, SACB10 y SACL 11 were of the biggest degradation ability, through measuring of the percentage of diminution of the 50%, 62% concentration of COD to the 48 and 72 hours to 66% a 79%.; it was determined that the isolations SAC SACB 02, SACL04, SACL07 were of the smallest degradation achieving to the 48 hours percentage evaluation of diminution of the concentration COD of 21%, 31% and 37%, 56% to the 72 hours. Finally with the 6 isolations of the biggest abilities, it was designed a mixed inoculum (Mix7) which reached to the 48 hours of evaluation an average percentage of diminution in the concentration of fats and oils and DQO of 72%, 75% respectively, During 48 hours of evaluation on scale of 4 liters, using sewage of effluents in the oil refining process of C.I. SACEITES S.A

* Degree proyect.

** Science Faculty, Chemistry Department, Directors: Dra. Janeth Aide Perea Villamil, Msc. José Vicente Otero Muriel,

1. INTRODUCCION

Los aceites y grasas vegetales (AVC) están destinados principalmente a la alimentación humana, sin embargo, también se utilizan como suplementos en alimentos para animales, con fines medicinales y en determinadas aplicaciones técnicas. Son importantes a nivel industrial y económico, ya que, a partir de ellos, se fabrican productos de alto valor agregado y elevado consumo para mesa, cocina, belleza y demás aplicaciones tales como: mantecas, margarinas, aceites mezclados, aceite refinado; productos complementarios de utilidad industrial, derivados cosméticos y biocombustibles (biodiesel).

Se obtienen de diversos frutos y semillas oleaginosas especialmente de Palma, Soya, Colza y Girasol, mediante extracción mecánica o por extracción con solventes, siendo posteriormente refinados según el uso que se vaya a dar. La refinación implica etapas de clarificación, neutralización, blanqueamiento y desodorización.

En las diferentes etapas de la obtención, procesamiento y transformación de los AVC y sus derivados, se generan residuos sólidos que tienen efectos contaminantes especialmente para el suelo y para el agua. Debido a su naturaleza, manejo y disposición final, estos residuos alteran la dinámica natural de los ecosistemas y degradan los recursos ecológicos. La clase y cantidad del residuo generado está asociada al tipo de oleaginosa, composición del aceite y proceso al que este se somete. Por ejemplo, en la cosecha comúnmente se generan residuos sólidos (hojas, restos de ramas, restos de poda, racimos de fruta vacíos, etc.), los cuales tienen un impacto directo en el suelo y en el aire, debido que alteran el equilibrio biológico de las comunidades macro y microscópicas, de tal forma que favorece la aparición de algunas plagas y enfermedades.

De otra parte, en los procesos de extracción y refinación del aceite generalmente se generan residuos líquidos (agua residual de los diferentes vertimientos de los procesos) que contienen restos de grasas y aceite, proteínas, carbohidratos, plaguicidas, gomas, mucilagos, metales, pigmentos, ácidos y sales, además de una alta concentración de sólidos en suspensión, que generan contaminación a nivel de las fuentes hídricas, debido que alteran el pH de los cuerpos de agua donde se vierten, disminuyen los niveles de oxígeno necesario para la supervivencia de muchos organismos, aumentan la demanda biológica (DBO) y química de oxígeno (DQO) e impiden el paso de la luz disminuyendo de este modo los procesos fotosintéticos, generando eutrofización y compuestos tóxicos.

Estudios realizados (Aluyor, et. 2001) para evaluar la contaminación de fuentes hídricas y suelos con residuos del procesamiento de aceites de origen vegetal, evidencian que en los países donde la producción de estos aceites y sus derivados son elevados, los problemas de contaminación e impacto negativo en los ecosistemas alcanzan niveles complejidad de orden superior. Ejemplo de ello es Malasia, donde la caracterización realizada a efluentes de empresas dedicadas a la extracción y refinación de aceite de palma muestra, que en promedio, presentan residuos de grasas y aceites que pueden superar los 7000 mg/l, materia orgánica representada como la demanda química de oxígeno por sus siglas en ingles DQO entre 45000 y 65000 mg/l, nitrógeno total entre 500 y 800 mg/l, sólidos totales superiores a 37 mg/l; niveles que sobrepasan los límites establecidos por las autoridades de regulación ambiental y han generado pérdida de parte de las fuentes de agua potable en muchas regiones del país.

En Colombia la mayor contaminación de los ecosistemas, por este tipo de residuos, se genera en los procesos de extracción y refinación del aceite crudo de palma, generalmente porque gran parte de las empresas encargadas de realizar estos procesos no cuentan con sistemas eficientes para el tratamiento de sus residuos, tal es el caso de C.I SANTANDEREANA DE ACEITES S.A., en

donde los efluentes corrientes provenientes del proceso de refinación de aceite de palma y soya, presentan alta concentración de residuos aceitosos y de materia orgánica contaminante, con valores de DBO que oscilan entre 5000 y 17000 mg/l, y de DQO que oscilan entre 2000 y 8000 mg/l. Como alternativa para el tratamiento de dichos vertimientos, la empresa ha aplicado durante años un sistema de tratamiento físico, que consiste en una Trampa de Grasas, sin embargo, con el aumento de la producción y de los residuos generados, los valores de los contaminantes presentes en el efluente del proceso, sobrepasan los límites establecidos por las normas de vertimiento actuales (decreto 1594 de 1984 para Demanda Química de Oxígeno (DBO) y Sólidos Suspendidos Totales (SST), el decreto de vertimientos D-3930 de 2010). Esto llevó a que la empresa entrara en un proceso riguroso de control y vigilancia por parte de la autoridad ambiental (a partir del 2010), para lo cual debe establecer e implementar en un plazo determinado, un Plan de Sostenibilidad Ambiental, teniendo como medida de choque principal, la implementación de un sistema de tratamiento adecuado que permita reducir la carga orgánica contaminante hasta los niveles permitidos en la normatividad vigente.

Si bien la elevada concentración de residuos aceitosos y demás materia orgánica contaminante presente en los vertimientos de la empresa C.I. SACEITES, podrían reducirse mediante la implementación de un sistema de tratamientos fisicoquímico como la aplicación de sales de aluminio o hierro, de ácidos, de polímeros, que permitan la coagulación de estos y la formación de agregados de materia orgánica fácil de retirar mediante procesos físicos; se estableció bajo criterios internos y políticas de manejo económico eficiente y de sostenibilidad ambiental, que dicho tratamiento resultaría altamente costoso para la empresa, además de ser ambientalmente inconveniente, ya que se requerirían grandes cantidades de sustancias químicas y se generarían elevados volúmenes de lodos peligrosos que requerirían procesos de manejo y disposición final.

Una alternativa al tratamiento químico, efectiva, económica y ambientalmente segura, para el manejo de estos residuos y para reducir la contaminación del efluente de C.I. SACEITES; sería la implementación de un sistema de tratamiento biológico aerobio; el cual permitiría degradar la materia orgánica contaminante presente en el vertimiento de la empresa y generar como subproducto final del proceso, lodos orgánicos que pueden ser aprovechados posteriormente para la formación de compost. Sin embargo, para que la implementación de dicho tratamiento sea posible, se requiere de un buen diseño de la planta de tratamiento, pero fundamentalmente de la obtención de microorganismos con la capacidad específica de transformar los contaminantes de interés (en este caso grasas y aceites, y demás materia orgánica) a compuestos más estables como son el CO₂ y el H₂O.

La bibliografía (Altan, et al. 2002) muestra que es posible degradar más del 80% de las grasas y demás materia orgánica contaminante presentes en vertimientos de empresas de extracción y refinación de aceites, similares a C.I. SACEITES, utilizando cepas de bacterias de los géneros *Pseudomona* y *Bacillus* y levaduras de los géneros *Candida* y *Yarrowia*, con actividad lipolítica, aisladas a partir de la misma fuente de contaminación. Bajo este contexto en este trabajo se planteó como objetivo general “Obtener a partir de residuos aceitosos sólidos y líquidos, microorganismos con capacidad para degradar las grasas y aceites vegetales presentes en el efluente del proceso de refinación de aceites de “C.I. SACEITES S.A”. Para lograr dicho objetivo se planteó, aislar bacterias y levaduras con potencial para la degradación de grasas y aceites vegetales, a partir de residuos líquidos y sólidos obtenidos del proceso de refinación de C.I. SACEITES S.A.; seleccionar de los microorganismos aislados, los de mayor capacidad para la degradación de grasas y aceites vegetales, con base en su efectividad para la disminución de DQO; con las bacterias y levaduras que presentaran mayor capacidad degradadora, desarrollar un inóculo mixto degradador de grasas y

aceites vegetales y por ultimo evaluar a escala de laboratorio la actividad biodegradadora de grasas y aceites del inculo mixto desarrollado.

2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 GRASAS Y ACEITES VEGETALES COMESTIBLES

Las grasas y aceites vegetales comestibles (AVC) son mezcla de moléculas de naturaleza lipídica, obtenidos a partir de frutos o semillas de plantas llamadas oleaginosas. Estos aceites ocupan un renglón importante en la industria de los alimentos y en la economía global, ya que a partir de ellos se fabrican productos comestibles para mesa y cocina como: mantecas, mantequillas margarina, aceites mezclados, aceite refinado; productos complementarios de utilidad industrial como algunos derivados cosméticos, ceras y en gran proporción biodiesel. (Aluyor, et al. 2009).

Según lo establecido por Planeación Nacional, en Colombia los aceites y demás derivados representan más del 4% en el PIB con un crecimiento promedio por año del 1,9 % entre 2001-2010, siendo el de palma el de mayor proporción.

2.1.1 Plantas Oleaginosas

Si bien existen un número considerable de plantas y vegetales de las cuales se pueden obtener aceites, generalmente para la fabricación de productos alimenticios, derivados industriales y biocombustibles, se prefieren las oleaginosas, debido que presentan un mayor rendimiento de producción con respecto a otras semillas o frutos. Los aceites y grasas que se obtienen de ellas contienen ácidos grasos saludables que pueden sustituirse o intercambiarse entre sí en los productos alimenticios, sin que estos presenten cambios en su composición sabor o textura; presentan mayor capacidad de adaptabilidad a diferentes condiciones agroecológicas y cambios en el entorno económico, hecho que permite la tecnificación y el manejo del cultivo a escalas masivas (Abrashev, et al. 2002).

Entre las plantas oleaginosas de mayor producción, consumo y preferencia en el mercado mundial, para la obtención de aceites y derivados, se encuentran la Soya (*Glycine soja*, Soja insípida, *Dolichos soja* L.), la Palma (*Elaeis guineensis* L.), la Colza o canola (*Brassica napus*, *Brassica campestris*), el Algodón (*Gossypium hirsutum*), Girasol (*Helianthus annuus* L.), el Olivo (*Olea europaea*), Maíz (*Zea mayz* L), el Lino (*Linum usitatissimum*), el Cacahuate (*Arachis hypogaea* L) y el Ajonjolí (*Sesamum indicum*). La gran mayoría se cultivan en sitios geográficos y condiciones agroecológicas específicas; en sistemas de monocultivos y periodos de tiempo que van desde uno año hasta treinta o más años. Se caracterizan por ser árboles, palmas o arbustos que almacenan gran contenido de lípidos en los tejidos de sus frutos o semillas como estrategia de rendimiento energético.

Dentro de los cultivos de oleaginosas mencionadas anteriormente, los que tienen mayor representatividad en mercado mundial están: el de Palma, Soya, Colza y Girasol. En la Tabla 1 se relacionan los promedios de producción de aceite a nivel mundial para el periodo comprendido entre el año 2002 y el 2008. Se destacan en el 2008 los cultivos de:

- Palma con una producción promedio mundial de 41.727 miles de toneladas, procedente en mayor proporción de Malasia Indonesia y de África (Nigeria).
- Soya con una producción mundial promedio de 38.621 miles de toneladas, procedente en mayor proporción de EEUU, Argentina, Brasil y China.
- Colza con una producción mundial promedio de 19.122 miles de toneladas, procedente en mayor proporción de China, India, Canadá, Europa, Francia y Alemania.
- Girasol con una producción mundial promedio de 9.872 miles de toneladas, procedente en mayor proporción de Rusia, Argentina, India y China.

Tabla 1. Producción mundial de aceites y grasas 2002-2008 (Miles de Toneladas).

Tipo Aceite	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008p
Aceite de soya	29.850	31.244	30.736	33.635	35.289	37.482	38.612
Aceite de palma	25.407	28.257	30.985	33.848	37.122	38.310	41.727
Aceite de colza	13.343	12.697	15.089	16.296	18.480	18.720	19.122
Aceite de girasol	7.610	8.896	9.393	9.759	11.173	10.890	9.872
Sebo y grasas	8.062	8.015	8.247	8.398	8.539	8.617	8.733
Aceite de maní	5.178	4.607	4.718	4.509	4.375	4.221	4.521
Aceite de algodón	4.221	3.992	4.371	5.008	4.915	5.060	5.138
Aceite de palmiste	3.044	3.347	3.582	3.977	4.345	4.453	4.815
Aceite de coco	3.098	3.270	3.038	3.240	3.115	3.108	3.282
Aceite de oliva	2.773	2.904	3.110	2.939	2.799	3.024	3.110
Aceite de maíz	2.016	2.017	2.025	2.135	2.274	2.326	2.386
Otros aceites	16.120	16.476	16.918	17.250	17.610	17.749	18.068
TOTAL	120.722	125.722	132.211	140.994	150.035	153.960	159.385

Fuente: Oil World Annual 2008 Disponible en:
<http://www.mic.gov.py/v1/sites/172.30.9.105/files/ACEITES-COMESTIBLES.pdf>

2.1.2 Oleaginosas en Colombia

En Colombia el cultivo de plantas oleaginosas, sus aceites y derivados representan un renglón importante de la economía en lo que se refiere al sector agroindustrial. Los cultivos de mayor producción en el país son: Palma de aceite, Soya, Ajonjolí y Algodón. El primero de ellos en un monocultivo permanente, considerado el producto agropecuario de mayor crecimiento en producción, tanto en el largo como en el corto plazo (un 79% entre el 2002-2011). Este hecho ha consolidado a la palma de aceite como uno de los pocos cultivos que sostiene el crecimiento de la agricultura nacional.

Según datos reportados por la FEDERACIÓN NACIONAL DE CULTIVADORES DE PALMA DE ACEITE (Fedepalma) en 2011, el sector alcanzó niveles récord en producción: 941.400 toneladas y 2.2 billones de pesos, 25% superior al 2010.

La mayor parte del aceite que se extrae de la Soya en Colombia, se destina para la fabricación de aceites comestibles, margarinas, jabones y como materia prima para la fabricación de galletas, helados, frituras etc. El aceite de Palma en cambio no solo se utiliza en la fabricación de productos alimenticios, cosméticos, jabones, si no que un porcentaje significativo de la producción, se está utilizando para la fabricación de biocombustibles (Biodisel).

2.2 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS AVC

La obtención de los aceites vegetales comestibles a partir de las semillas o frutos de plantas oleaginosas, requiere de dos etapas: la primera de ellas se inicia con la siembra del cultivo, cosecha de las semillas (Altan, et al. (2004).

2.2.1 Extracción

s o frutos y extracción del aceite; la segunda etapa, consiste en la refinación y transformación de los aceites crudos y sus derivados en productos que se utilizan en la industrias de los alimentos, detergentes, cosméticos, farmacéutica, automotriz etc.

La extracción del aceite a partir de los frutos oleaginosos puede realizarse por dos métodos: mecánico o extracción utilizando solventes. El método de extracción mecánico, consiste en el ablandamiento de la semilla o fruto mediante calor en una autoclave y posterior extracción del aceite por medio de prensas hidráulicas. En el método químico, se emplean solventes para separar el aceite crudo de los tejidos fibrosos, posteriormente, la mezcla se destila para separar el solvente del aceite crudo. La selección del procedimiento, métodos y maquinarias para la extracción depende del tipo de oleaginosa empleada, contenido de ácidos grasos y uso al que se destinen el aceite y sus derivados, por ejemplo, el sistema de extracción mediante prensado se utiliza para semillas o frutos con mayor

contenido de ácidos grasos, en contraste el sistema que usa solventes, se emplea para semillas o frutos con mayor contenido de fibra.

En lo que se refiere a la extracción de aceite de palma las etapas que se llevan a cabo en el proceso se pueden resumir en:

- Almacenamiento y limpieza: en estos procesos cobra importancia controlar la temperatura, ventilación y humedad de tal forma que se garantice la eliminación de impurezas, hongos o bacterias que puedan alterar la calidad del aceite.
- Esterilización: Se realiza en los frutos de plantas oleaginosas con el fin de desnaturalizar las lipasas que pueden elevar la acidez del aceite extraído y para facilitar el desprendimiento de los frutos del racimo y la almendra de la cáscara.
- Desfrutamiento. Proceso por el cual los frutos son separados del racimo.
- Digestión. Mediante la aplicación de calor se busca el rompimiento de las células de tal forma que se pueda liberar el aceite contenido en ellas y para que se dé un desprendimiento entre la pulpa y la nuez.
- Clarificación. Proceso de recuperación y purificación del aceite, liberándolo de impurezas como lodo y barro.

2.2.2 Refinación

El aceite obtenido a partir del proceso de extracción es una mezcla de triglicéridos y otras sustancias orgánicas e inorgánicas, las cuales pueden alterar algunas de las propiedades de éste como el color, olor, sabor, la textura y la viscosidad entre

otras. Es por ello, que dependiendo del uso para el cual se destine el aceite, se requiere someterlo a un proceso de refinación, en el cual se eliminan gomas, mucilagos albuminoides, ácidos grasos, fosfátidos, pigmentos, componentes volátiles y otros materiales. El proceso de refinación puede darse de forma continua o discontinua e implica varias etapas a saber: clarificación, neutralización, blanqueamiento y desodorización.

- Neutralización: este proceso busca la eliminación de los ácidos grasos libres ya sea por neutralización con sales cáusticas, amoníaco, soda, carbonatos de calcio o magnesio y silicatos alcalinos o por destilación, en condiciones de temperatura superiores a los 75 °C.
- Blanqueo: el proceso de blanqueo elimina restos de jabón, fosfátidos y pigmentos, mediante la aplicación de arcillas y tierras de blanqueo. Con esto se logra que el aceite tenga un aspecto más transparente y de mayor aceptación cuando se destina para el sector de los alimentos.
- Desodorización: este proceso conlleva la eliminación de olores y de compuestos que alteran el sabor como por ejemplo: Aldehídos, Cetonas, Ácidos grasos libres e Hidratos de carbono saturados, subproductos de la oxidación y degradación del aceite, compuestos coloreados, residuos de pesticidas, etc. Se logra al pasar una corriente de vapor sobrecalentado a través del aceite a un alto vacío. La desodorización se efectúa generalmente en procesos semicontinuos o continuos, debido al alto consumo energético que se requiere para el precalentamiento del aceite hasta la temperatura apropiada de operación y para la generación del vapor de proceso. Aunque esta operación podría realizarse por lotes, el uso de la energía sería ineficiente.

2.3 COMPOSICIÓN DE ACEITES

La composición química de los AVC de origen vegetal corresponde en la mayoría de los casos a una mezcla de 95% de triglicéridos y 5% de ácidos grasos libres, de esteroides, ceras y otros componentes minoritarios: La mayoría de los aceites vegetales tienden a contener más ácidos grasos insaturados que los aceites de origen animal y en consecuencia son líquidos a temperatura ambiente. Sin embargo, contienen también ácidos grasos de diferente longitud de cadena y grados de saturación, lo que les confiere diferentes propiedades y distintas funciones (Bahruddin (2008), Fernández, (2005)).

Los ácidos grasos presentes en los aceites vegetales se pueden dividir en: Ácidos grasos saturados como láurico, palmítico y esteárico; monoinsaturados como el oléico presente en aceituna, cacahuete, colza, sésamo etc. y los poliinsaturados como linoleico presente en girasol, algodón, maíz, soja, etc. (Bahruddin (2008), Bogaerts (1990)). La distribución en porcentaje de los ácidos grasos en las oleaginosas varía considerablemente de un género a otro y entre especies. En la Tabla 2 se muestra la composición en ácidos grasos de las oleaginosas más representativas.

Tabla 2. Contenido de ácidos grasos de diferentes derivados oleaginosos.

Gramos de Ácidos grasos de los aceites y grasas por cada 100g			
Clase de aceite por cultivo	Saturados	Monoinsaturados	Poliinsaturado
Aceite de cacahuete (maní)	19	48	29
Aceite de cártamo	10	13	72
Aceite de coco	85	6.6	1.7
Aceite de colza	7	57	32
Aceite de girasol	12	20	63
Aceite de maíz	13	25	58
Aceite de oliva	14	70	11

Gramos de Ácidos grasos de los aceites y grasas por cada 100g			
Aceite de palma	45	42	8
Aceite de semilla de algodón	26	21	48
Aceite de soja	15	23	57
Manteca de cerdo	41	44	9
Mantequilla	54	20	2.6
Margarina blanda	25	31	22
Margarina dura	36	33	9
Margarina poliinsaturada	16	21	41
Sebo	48	32	2

Fuente: ANIAME 2003

2.4 RESIDUOS Y CONTAMINACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y REFINACIÓN

En los procesos de: producción, extracción, refinación y transformación de aceites vegetales, se generan residuos sólidos y líquidos, que tienen impacto directo en el suelo y en las fuentes hídricas, alterando el equilibrio de los ecosistemas. La clase y cantidad de residuos generados, está asociada al tipo de oleaginosa, composición del aceite y el proceso que se esté llevando a cabo. Se sabe que los residuos sólidos se generan en mayor proporción en el proceso de producción siendo un porcentaje significativo de estos de naturaleza orgánica. Los residuos líquidos se generan en la extracción y refinación y son de dos tipos, orgánicos e inorgánicos.

2.4.1 Residuos del Cultivo y Producción

En esta etapa es común que se generen residuos sólidos orgánicos como hojas, restos de ramas, restos de poda, racimos de fruta vacíos etc. Normalmente el productor no implementa estrategias para el manejo y la disposición de dichos residuos, lo que genera impactos a nivel del suelo y el aire, debido que alteran

el equilibrio biológico de las comunidades macro y microscópicas, de tal forma que se favorece la aparición de algunas plagas y enfermedades.

2.4.2 Residuos de la Extracción

En el proceso de extracción, se realiza el desgranado de los racimos o semillas y la extracción del aceite según sea el caso, lo cual generan residuos sólidos y líquidos. Los residuos sólidos contaminantes están asociados al resto de material fibroso del estrujado del fruto, resto de cáscaras y racimos entre otros. Los residuos líquidos están constituidos por el agua residual producto de los diferentes vertimientos del proceso, los cuales se caracterizan por contener compuestos químicos (ácidos y sales, restos de aceite y demás materia orgánica), usados para la clarificación, digestión, esterilización etc., del aceite extraído. Dichos compuestos químicos ya sean orgánicos o inorgánicos generan contaminación ambiental a nivel de las fuentes hídricas, debido que alteran el pH de los cuerpos de agua donde se vierten, disminuyen los niveles de oxígeno necesario para la supervivencia de muchos organismos, algunos reaccionan entre sí, de tal forma que se convierten en tóxicos. (Bhumibhamo, et al. 2002; Bogaerts, et al. 1990).

2.4.3 Residuos de la Refinación

Los residuos del proceso de refinación generan mayor impacto y contaminación a nivel de las fuentes hídricas. Esto se debe a la elevada concentración de materia orgánica representada por grasas, aceites, proteínas, carbohidratos así como plaguicidas residuales derivados del tratamiento de las materias primas. (Bhumibhamo, et al. 2002); los ácidos usados en el refinado químico del aceite crudo, las tierras decolorantes que contienen gomas, metales y pigmentos; el residuo de aceites procedente de la destilación por vapor, el mucílago procedente del desgomado, los catalizadores y filtros empleados en el proceso, además de una alta concentración de sólidos en suspensión presentes en las

aguas residuales vertidas, que aumentan la demanda biológica (DBO) y química de oxígeno (DQO); impiden el paso de la luz, disminuyen los procesos fotosintéticos y generan procesos de eutrofización y reacciones tóxicas (Bogaerts, et al. 1990).

Yeong y col. 2010), referencia estudios de la caracterización de efluentes de empresas dedicadas a la extracción y purificación de aceite de palma en Malasia durante el periodo comprendido entre 1979 y 2009, mostrando que en promedio, las aguas residuales presentan residuos de grasas y aceites que puede superar los 7000 mg/l, materia orgánica representada como DQO entre 45000 y 65000 mg/l, de nitrógeno total entre 500 y 800 mg/l, de sólidos totales superiores a 37 mg/l etc., (ver Tabla 3). Con esta caracterización se evidencia que las aguas residuales que se generan en la producción y extracción de aceite de palma se caracterizan por sus altos niveles de contaminación orgánica e inorgánica, por lo que deben ser sometidas a tratamientos para reducir la concentración de los agentes contaminantes hasta los valores permitidos por la normatividad de país. En el Anexo B Figura 19 se muestra el un diagrama del proceso de refinación de aceite de palma y los diferentes residuos generados en cada una de las etapas.

Tabla 3. Características físico-químicas de los efluentes generados en el procesamiento de aceite de palma en Malasia (POME).

Parameter a	Concentration range (mg/l)	Element	Concentration range (mg/l)
pH	4.15 - 4.45	Phosphorus	94 -131
COD	45.500 -65.000	Potassium	1.281 -1.928
Soluble COD	20.500 – 24.500	Magnesium	254 -344
BOD	21.500 – 28.500	Calcium	276 -405
Total solid	33.790 – 37.230	Manganese	2.1 -4.4
Total volatile solid	27.300 – 30.150	Iron	75 - 164

Parameter a	Concentration range (mg/l)	Element	Concentration range (mg/l)
TSS	15.660 – 23.560	Zinc	1.2 -1.8
Total dissolved solid	15.500 – 29.000	Copper	0.8 -1.6
Oil and grease	1.077 -7.582	Chromium	0.05 -0.43
Total nitrogen	500 -800	Cobalt	0.04 -0.06
		Cadmium	0.01 -0.02

Fuente: Yeong, et al. 2010 / Journal of Environmental Management. (91)1467e1490
Las unidades de los parámetros están dadas en mil. (mg/l) excepto pH

2.4.4 Residuos de la Producción de Aceites en Colombia

En Colombia no hay reportes similares a los referenciados por (Yeong y col 2010), sin embargo, se sabe que la mayor contaminación de los ecosistemas por este tipo de residuos, se genera en los procesos de extracción y refinación del aceite crudo (especialmente de palma), por ejemplo, en la extracción de aceite de palma se genera gran cantidad de biomasa (restos de cáscaras, frutos, racimos etc.) que generalmente, se disponen a la intemperie en la periferia de las plantas extractoras sin un adecuado manejo o tratamiento. Las aguas residuales generadas en este mismo proceso son vertidas en los cuerpos de aguas sin ningún tipo de tratamiento o luego de ser sometidas a tratamientos poco efectivos. En cuanto al proceso de refinación es común que se genere gran cantidad de tierras de blanqueo saturadas de proteínas, carotenos y lípidos; aguas residuales con elevada concentración de residuos de aceite, gomas, jabones, residuos de sales y ácidos.

En el 2010, el Ministerio del Medio Ambiente expidió el decreto 3930, con el cual se reglamentó y adoptaron disposiciones para la vigilancia y el control de los vertimientos de las empresas y demás industrias. Con este decreto se otorgó a las autoridades ambientales regionales, elementos legales necesarios, para que

ejercieran el control de los residuos y vertimientos en las empresas, entre ellas las relacionadas con la extracción y refinación de aceites.

2.5 TRATAMIENTOS FÍSICOS, QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

La mayoría de los tratamientos empleados para el control de los residuos sólidos y líquidos, que se generan en la obtención de aceites vegetales a partir de oleaginosas, se enfocan en reducir la contaminación a nivel de las fuentes hídricas, lo que se conoce como depuración de las aguas residuales, los efluentes y vertimientos. Dichos tratamientos puede ser físicos, químicos, biológicos o mixtos.

2.5.1 Tratamientos Físicos

Los tratamientos físicos son implementados cuando los residuos de materia orgánica contaminante (en especial las grasas y aceites) están presentes en concentraciones suficientemente altas, que pueden separarse de la fase líquida por métodos físicos como por ejemplo: flotación, decantación, centrifugación, filtración, sedimentación, entre otros. Con estos métodos se logra reducir la carga contaminante y la recuperación de las grasas y/o aceites potencialmente útiles (Bogaerts, et al. 1990). Ejemplos de este tipo de tratamiento son los llamados “fattrap” o trampas de aceite (Chaux, et al. 2009), la flotación de las grasas por aire disperso (DAF) o aire disuelto y los métodos electrolíticos (Li, et al. 2005). Los sistemas DAF se basan en la inyección directa de microburbujas de aire en un tanque de estabilización con una presión de 5 bar, las burbujas empujan las grasas y aceites formando una nata que puede retirarse por métodos mecánicos. (Espinoza, et al. 2008), sostiene que los sistemas de flotación con aire disperso, logran remociones de sólidos entre 50 y 98% y DBO5 (Demanda Biológica de Oxígeno) entre 10 y 30% con un tiempo de retención de 2-4 horas.

El inconveniente con los tratamientos físicos (flotación, decantación, centrifugación, filtración, sedimentación), es que no existe transformación o degradación del material contaminante, por tal motivo, este no se estabiliza o reduce a niveles menos tóxicos y además, son poco efectivos para remover contaminantes disueltos, es decir, que están en bajas concentraciones (Hermosilla, et al. 2008).

2.5.2 Tratamientos Químicos

Los tratamientos químicos de manera general, se complementan con el uso de métodos físicos de separación y se caracterizan por emplear procesos de coagulación, floculación, neutralización, entre otros. En la mayoría de estos tratamientos se utilizan sustancias (sales, ácidos o polímeros) que tienen la capacidad de romper la repulsión partícula-partícula en las grasas emulsionadas que impiden el proceso de coagulación espontánea, de modo que se genere agregados de materia orgánica fácil de retirar mediante procesos físicos. Un ejemplo de ello es la desestabilización de los sistemas grasos emulsificados, a través de la neutralización de la carga por ajuste de pH o la adición de iones de carga opuesta como el hierro, el aluminio, entre otros, lo que permite la formación de floculos de grasas y aceites de gran tamaño y baja densidad, que pueden ser separados por flotación o sedimentación (Mansee, et al. 2004; Bhumibhamo, et al. 2002). Los inconvenientes de los tratamientos químicos o fisicoquímicos tienen que ver con la toxicidad de los lodos y residuos que se generan postratamiento, lo que implica mayores costos asociados al manejo y tratamiento de dichos residuos (Hermosilla, et al. 2008).

2.5.3 Tratamientos Biológicos

Los tratamientos biológicos para el manejo de la contaminación generada por los procesos de extracción y purificación de las grasas y aceites vegetales, se basan en la utilización de microorganismos para la transformación (biotransformación o

biodegradación) de los residuos en compuestos menos tóxicos o estables. En este tipo de tratamientos se estimula la formación de poblaciones de bacterias, hongos levaduriformes y filamentosos, para que, bajo condiciones y parámetros operacionales controlados, utilicen como nutrientes la materia orgánica contaminante presentes en el agua residual (Mansee, et al. 2004); Muñoz, et al. 2005). Las condiciones del proceso en las que se da la transformación de los contaminantes, puede ser en presencia de oxígeno o en ausencia de éste, motivo por el cual, se les designa con el nombre de tratamientos anaerobios o tratamientos aerobios.

Los tratamientos aerobios requieren de la inyección de aire y tienen la particularidad de que la degradación del contaminante se da hasta compuestos inorgánicos no tóxicos o más estables; como producto final de la degradación se genera CO₂ y concentraciones elevadas de lodos; se les denomina lodos activados y se consideran más factibles para el biotratamiento de aguas residuales de origen industrial (Altan, et al. 2004; Bhumibhamo, et al. 2002). En contraste, los tratamientos anaerobios tienen la particularidad, de que los procesos microbiológicos, se desarrollan principalmente en ausencia de oxígeno o aire; la digestión de la materia orgánica se da de manera incompleta y como productos del proceso de degradación se genera CO₂ y metano. Sin embargo, los tratamientos anaerobios presentan algunas ventajas frente a los de tipo aerobio: requieren de instalaciones menos costosas; no hay necesidad de suministrar oxígeno, por lo cual el proceso es más barato; el requerimiento energético es menor; se produce además 20% menos cantidad de lodos en comparación con los tratamientos aerobios (Łobos, et al.2009; Melike, et al. 2008).

2.6 BIODEGRADACIÓN DE GRASAS Y ACEITES

Sin importar el tipo de tratamiento biológico que se utilice para la transformación o degradación de grasas y aceites, todo ellos son llevados a cabo por grupos de

bacterias, hongos levaduriformes o filamentosos, a través de reacciones metabólicas mediadas por un conjunto de enzimas entre las que se destacan, lipasas, fosfolipasas, esterases etc., (Li, et al. 2005). Estas enzimas tienen la función específica de hidrolizar las grasas, el cual es el primer mecanismo empleado por los microorganismos para transformar o degradar las grasas, facilitando la biodisponibilidad de estas, al reducir su complejidad molecular y tamaño polimérico hasta monómeros de ácidos grasos.

2.6.1 Lipasas de Origen Microbiano

Las lipasas hidrolizan triglicéridos a ácidos grasos y glicerol y bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa. Son, también, capaces de catalizar reacciones de transesterificación e hidrólisis. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y están presentes en los procesos metabólicos de algunas plantas y animales. Son producidas por un gran número de microorganismos, a partir de los cuales se obtienen para fines comerciales y el desarrollo de tratamientos biológicos; un ejemplo típico son las lipasas producidas por los géneros de: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Serratia*, *Rhizopus*, *Candida*, entre otros, que se utilizan en la industria textil, de los detergentes y farmacéutica (Macris, et al.1996), Mansee, et al. 2004; Muñoz, et al. 2005).

Aluyor, et al. 2009), plantea que la biodegradación de grasas y aceites vegetales por los microorganismos, es un proceso que puede ser utilizado en el tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria de extracción y refinación de aceites y grasas, debido a que, este tipo de tratamiento permite una remoción de contaminantes entre un 70%-100% , generándose subproductos seguros para el medio ambiente, gracias a que los microorganismos responsables del proceso de degradación, tienen la maquinaria enzimática para incorporar las grasas a su metabolismo hasta convertirlas en CO₂ y agua. (Saifudin, et al.2006).

(Altan, et al. 2004), empleando residuos de aceite de oliva, muestras de suelo de fábricas extractoras de aceite impactado con residuos aceitosos y Tween 20, logró aislar e identificar 69 enzimas extracelulares con actividad lipolítica, a partir de 82 cepas de *Bacillus termófilos*. Dichas enzimas presentaron actividad hidrolasa y estearasa frente a grasas y aceites vegetales (Ortega, et al. 2008).

Bhumibhamon y colaboradores (2002), emplearon cepas de *Acinetobacter sp*, de *Bacillus sp* y de *Pseudomonas. sp* en cultivo puros y en cultivo mixto, para tratar aguas contaminadas con residuos aceitosos de una fábrica extractora y refinadora de aceite de palma, mediante procesos de agitación y aeración continua, lograron una remoción de más del 80% de las grasas y aceites presentes en estos residuos líquidos.

En Colombia no se encontraron reportes relacionados con el aislamiento y la evaluación de microorganismos lipolíticos para el tratamiento de este tipo de residuos. Sí se evidencia el uso de enzimas comerciales con actividad lipolítica para mejorar la capacidad de los sistemas trampa de grasas; esto debido que las enzimas aumentan el rompimiento de la emulsión, aumentando con esto la flotabilidad de las grasas y permitiendo que se retiren con mayor facilidad por métodos físicos (Melike, et al. 2008).

2.6.2 Biodegradación Grasas y Aceites

La biodegradación de las grasas y aceites se lleva a cabo en dos etapas, una extracelular y una intracelular. En la primera de ellas inicialmente se da el rompimiento enzimático de los enlaces principales presentes en la molécula del lípido, de tal forma que se generan monómeros de menor tamaño, los cuales pueden atravesar la membrana de la célula microbiana. La reacción de hidrólisis es llevada a cabo por lipasas, esterases o fosfolipasas (proteínas hidrófobas que catalizan la escisión de enlaces éster carboxilo, en tri-, di-, y

monoacilglicérol), según sea la molécula, que dan lugar a ácidos grasos y glicérol. En la segunda etapa, la cual se da en el interior de la célula, los ácidos grasos y demás monómeros, pueden ser catabolizados por la ruta denominada Beta-oxidación; que en las células microbianas eucariotas (levaduras y hongos filamentosos) se da en las mitocondrias, mientras que en las células procariotas (bacterias) se da en citoplasma.

En la Beta-oxidación, inicialmente los ácidos grasos se activan con la coenzima-A, luego la oxidación resultante libera acetil co-A y ácidos grasos más cortos, al perder dos carbonos. Este proceso se repite de manera paralela a dos reacciones de deshidrogenación independientes. En la primera se transfieren electrones a la coenzima flavin-adenina dinucleótido (FAD), mientras que en la segunda se transfieren al NAD⁺. La Beta-oxidación tiene como meta general producir el mayor número posible de moléculas de acetil-CoA, las cuales posteriormente son oxidadas por medio del ciclo del ácido cítrico o se convierte en hexosas y otros constituyentes celulares mediante el ciclo del glioxalato. Se sabe que los ácidos grasos son buenos donadores de electrones, ejemplo de ello, es la oxidación anaeróbica del ácido palmítico (de 16 carbonos) en la cual se sintetizan 129 moléculas de ATP, por fosforilación debida al transporte de electrones generados durante la formación de acetil- CoA, por beta oxidación y la oxidación misma de las unidades de acetil-CoA por el ciclo del ácido cítrico.

3. METODOLOGÍA

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Experimental. Diseño factorial de medidas repetidas en el tiempo y grupo control

3.2 MUESTREO

El lugar seleccionado para tomar las muestras fue el sistema de Trampa de grasa, perteneciente a la empresa C.I.SANTANDEREANA DE ACEITESS.A., ubicada en el parque Industrial de Girón, vía Chimita. Se realizaron cuatro muestreos al azar. En cada uno de ellos se tomó una muestra compuesta de 2 litros, a partir de distintos puntos y profundidades de la trampa de grasa, las cuales se adicionaron en frasco ámbar tipo Wincler y se almacenaron en condiciones de refrigeración ($8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) hasta su procesamiento. También se tomaron muestras de los residuos aceitosos colectados a partir de la trampa de grasa y que se disponen en canecas de plástico; para ello en bolsas Ziploc, bajo condiciones estériles, se tomaron submuestras de diferentes canecas y profundidades hasta completar 1 kg. Luego se llevaron a refrigeración ($8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) hasta su procesamiento. A las diferentes muestras se les realizó la medición de pH a fin de tener un parámetro indicativo de las condiciones de la matriz.

3.3 AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS Y LEVADURAS CON POTENCIAL DEGRADADOR

Las muestras sólidas y líquidas se utilizaron para el aislamiento de bacterias y levaduras con capacidad biodegradadora de grasas y aceites vegetales. El aislamiento se realizó en tres fases continuas: a) preenriquecimiento no selectivo, b) adaptación selectiva de microorganismos con capacidad de utilizar aceites

vegetales como única fuente de carbono y c) aislamiento selectivo de éstos en medio sólido

3.3.1. Preenriquecimiento no Selectivo

Para el preenriquecimiento, de cada muestra líquida (de la trampa de grasa) se tomó una alícuota y se adiciono en matraces de 250 ml con medio Líquido Mínimo Basal Salino (MBS) en proporción 70:30. Los matraces fueron dejados en agitación constante a 30 °C y 150 rpm hasta que se evidenció turbiedad en el medio (en promedio 6 días).

Para el preenriquecimiento a partir de las muestras sólidas, de cada una de ellas se tomó 10 g y se adicionaron en proporción 10:90 en el medio (MBS); los montajes se dejaron bajo agitación constante a 30 °C y 150 rpm hasta que se evidenció turbiedad en el medio (en promedio 8 días). El MBS está constituido por 1.3 g/l (NH₄)₂SO₄, 0.9 g/l K₂HPO₄, 0.6 g/l KH₂PO₄, 0.2 g/l MgSO₄·7H₂O, 0.1 g/l extracto de levadura, 0.5 g/l CaCO₃.

3.3.2. Adaptación de Microorganismos

A partir de los caldos de preenriquecimiento se tomaron alícuotas de 10 ml y se adicionaron (proporción 1:90) en matraces de 250 ml con (MBS) suplementado con aceite de palma y soya relación 1:1 al 0.05%. Los matraces fueron dejadas bajo agitación constante a 30°C y 150 rpm, hasta que se evidenció turbiedad en el medio (en promedio 3 días).

3.3.3. Aislamiento Selectivo

De los caldos de adaptación se tomó 0,1 ml y se sembró de manera masiva con rastrillo estéril en cajas Petri con (MBS) sólido suplementado con aceites de

soya+ palma al 0,05 % como única fuente de carbono, las cajas se incubaron a 37C° durante 96 horas. Pasado este tiempo se verifico el número de colonias diferentes crecidas en las cajas. A cada una de estas colonias por separado se les realizo 2 pases sucesivos en medio (MBS) sólido y se les verificó su morfología macroscópica y microscópica a fin de establecer cultivos puros. Cada cultivo puro correspondió a un aislamiento. El termino aislamiento se refiere al microorganismo o las colonias de este, que no puede ser considerado Cepa, debido que no se ha caracterizado o identificado concluyentemente, mediante técnicas estándar como las moleculares.

3.3.4 Selección de Microorganismos con Potencial Degradador

La selección de los Aislamientos con potencial degradador se realizó a través de una prueba tamizaje, esto con el fin de asegurar que el crecimiento de los microorganismos en el medio estuviese asociado al uso del aceite únicamente. Para esto, de cada Aislamiento se tomó una colonia y se inoculo en tubos con MBS+ aceite al 0,05%, los tubos fueron incubados en agitación constante 150 rpm a 30 °C, durante 48 horas. Posteriormente se observó si existía algún cambio en los tubos inoculados con respecto a los controles. Los controles consistieron en tubos de MBS sin aceite, inoculados con los Aislamientos y tubos con MBS+ aceite al 0,05% sin inocular.

3.4 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS CON MAYOR CAPACIDAD DEGRADADORA

La selección de los Aislamientos con mayor capacidad degradadora de grasa y aceite se realizó en MBS modificado con la adición de aceite soya-palma a 2000 mg/l. Para ello, de cada Aislamiento se preparó un inoculo en fase log de crecimiento a una concentración de 10⁹ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC.ml⁻¹), el cual se adicionó al 10 % v/v en fíolas con 200 ml de MBSF,

bajo condiciones de aeración constante y temperatura ambiente ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$). Seguido de esto, se determinó la concentración de grasa y aceite presentes en el MBS modificado que cada aislamiento fue capaz de degradar a las 48 y 72 horas con respecto a un control, tomando como parámetro el porcentaje de disminución de DQO. Los tiempos de evaluación de 48 y 72 horas fueron establecidos bajo el criterio de: tiempos de retención para un posible sistema de tratamiento, según lo establecido por la Empresa. La concentración de cada inóculo se determinó mediante la correlación con una curva de crecimiento, que relaciona densidad óptica vs el recuento de células viables en UFC.ml-1 las curvas de crecimiento de cada aislamiento se muestran en el Anexo A de la Figura 8 a la Figura 18.

El porcentaje de disminución de DQO se determinó por triplicado para cada una de los Aislamientos y el respectivo control, mediante el método 8043 HACH-DR2800. El resultado de la medición (Absorbancia a 600 nm de DQO) se relacionó en una curva de calibración con la concentración de aceite. El control consistió en fíolas con 200 ml de MBS modificado sin la adición de inóculo, dejadas bajo aireación constante y temperatura ambiente. Los Aislamientos que presentaron los mayores porcentajes de disminución de DQO, fueron seleccionados para el desarrollo de un inóculo mixto.

3.5 DESARROLLO DEL INÓCULO MIXTO

Para conformar el inóculo mixto a los Aislamientos de mayor actividad degradadora, en diferentes mezclas, se les realizó pruebas antagónicas botón en césped (Bauer, et al.1966); aquellos que no presentaron inhibición, se les evaluó en mezclas, la actividad degradadora, mediante la determinación del porcentaje de disminución de DQO. El porcentaje de disminución de DQO se determinó por triplicado para cada una de las mezclas y el respectivo control en el MBS modificado, a las 48 horas. Los Aislamientos se inocularon al 10% v/v con una

concentración de 109 ufc/ ml-1. La mezcla que presentó la mayor actividad degradadora fue establecida como inóculo mixto.

3.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEGRADADORA A PEQUEÑA ESCALA

La evaluación de la actividad degradadora del inóculo mixto, se realizó empleando agua residual de la trampa de grasa. Para esto, inicialmente cada Aislamiento por separado se dejó crecer en medio nutritivo hasta alcanzar una concentración de 1010 ufc/ml, luego se mezclaron en proporciones iguales, y la mezcla se adicionó al 10% v/v y una concentración de 109 ufc/ml-1 en un biorreactor con agua residual (4000 ml de volumen de trabajo) Las condiciones fijadas para el proceso fueron aireación constante a temperatura ambiente (27 ± 3 °C) durante 48 horas. La actividad degradadora se determinó a través de la medición del porcentaje de remoción de grasa y aceites y DQO presente en el caldo de fermentación logrado por el inóculo a las 48 horas. La concentración de grasas y aceites se determinó usando el método soxhlet (ASTM 552) y la concentración de DQO usando el método 8043 HACH-DR2800, los dos parámetros al inicio y al final del proceso.

3.7 CURVA DE CRECIMIENTO: DENSIDAD ÓPTICA VS UFC

Para realizar la curva de crecimiento de cada microorganismo, se preparó un inóculo a partir de una colonia en cajas Petri de 24 horas de crecimiento, la cual se adicionó en tubos con caldo nutritivo para bacterias y medio sabouraud para levaduras. La incubación se realizó a 30 C° durante 24 horas para las bacterias y 36 horas para levaduras. Cada 2 horas se tomó un tubo para hacer recuento en placa y medir densidad óptica a 540 nm. Los resultados obtenidos se linializaron mediante la aplicación de Log10 y se ajustaron a una recta con la cual se halló la ecuación que relaciona las UFC vs Densidad óptica.

3.8 MEDIO BASAL DE SALES MODIFICADO (MBSMF)

Para definir el tipo y concentración de los componentes y sales del caldo de fermentación, inicialmente se realizó la caracterización del efluente de la empresa en cuanto a: Materia orgánica, N,P,K pH, Grasas totales etc. De acuerdo a los resultados obtenidos, se adicionaron los nutrientes en el caldo.

3.9 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó un diseño factorial 11x2 con tres réplicas, con los factores (Aislamiento y Tiempo), El software utilizado para el análisis de los resultados del diseño factorial fue SPSS v.14, Minitab v.15 y Microsoft Excel 2007. Los niveles de cada factor están representados a continuación:

FACTOR	NIVELES
Tiempo	48 Horas
	72 Horas
	SACL01
	SACB02
	SACL03
Aislamiento	SACL04
	SACL05
	SACL06
	SACB07
	SACL08
	SACL09
	SACB10
	SACL11

Modelo estadístico lineal multiplicativo utilizado fue

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \left\{ \begin{array}{l} i = 1, 2. \text{Tiempo} \\ j = 1, 2 \dots 11. \text{Aislamientos} \end{array} \right.$$

Donde

μ : Efecto general medio
 τ_i : Efecto del i - esimo nivel del factor A : Tiempo
 β_j : Efecto del j - èsimo nivel del factor B : Aislamientos
 $(\tau\beta)_{ij}$: Efecto de interacciòn entre τ_i y β_j : *Tiempo * Aislamientos*
 ε_{ij} : Tèrmino de error aleatorio, donde $\varepsilon_{ij} \approx \text{NID}(0; \sigma^2)$

Contraste de hipótesis

Contraste de Hipótesis

$$\left\{ \begin{array}{l} H_o : \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 \\ H_i : \beta_i \neq 0 \quad \text{para al menos un } i, i = 1, 2, 3, \end{array} \right.$$

Contraste de Hipótesis

$$\left\{ \begin{array}{l} H_o : (\tau\beta)_{ij} = 0 \quad \text{para toda } i, j \\ H_i : \text{al menos un } (\tau\beta)_{ij} \neq 0 \end{array} \right.$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el aislamiento de los microorganismos se tomaron muestras líquidas y muestras sólidas. Las muestras líquidas (agua residual) se tomaron del sistema de Trampa de grasa de la empresa C.I. SACEITES S.A, diseñado para el tratamiento físico del efluente del proceso de refinación de aceite de Palma y de Soya, el cual tiene un área de aproximadamente 38 m², distribuidos en 37 compartimientos; el primer tercio del sistema tiene una profundidad de 60 cm y finaliza con una profundidad de 30 cm (ver Figura 1A). El sistema maneja un caudal promedio de 0,26 l/s; en los extremos laterales mantiene un flujo turbulento para aumentar la oxigenación de agua.

Las muestras de residuos sólidos se tomaron de los sobrenadantes del sistema Trampa de grasa, colectados en canecas plásticas.

Las muestras de agua residual se caracterizaron por presentar una coloración amarillenta, olor característico a jabón y elevada concentración de aceite residual; las muestras sólidas, se caracterizaron por un color amarillo claro, olor característico a detergentes y consistencia blanda (ver Figura 1B).

Con los análisis del monitoreo y seguimiento periódico que la empresa hace del efluente, se establecieron los parámetros de pH, Temperatura, Sólidos totales, DQO y Grasas y aceites (%) para las muestras líquidas, a las muestras sólidas únicamente se les determinó el pH.

En la Tabla 4, se relacionan los resultados de los análisis realizados a las muestras de agua residual y residuos sólidos de aceites, junto con la codificación establecida para cada una de ellas.

Figura 1. Muestras para el aislamiento de microorganismos con capacidad para la degradación de grasas y aceites vegetales.



Registro fotográfico: Bayron Agualimpia V.
A Sistema Trampa de grasas C.I. SACEITES S.A,
B Muestra de agua residual del sistema para el aislamiento de microorganismos
C Tanque de recolección de residuos sobrenadantes aceitosos
D Muestra sólida para el aislamiento de microorganismos

Las muestras de agua residual presentaron diferencias en los valores de pH, sin embargo, en todas ellas fueron ligeramente ácidos con un valor promedio de pH (5,43). En contraste, los valores encontrados en las muestras sólidas fueron más estables y cercanos a la neutralidad, con un nivel promedio de pH (6,20).

Tabla 4. Resultados de los análisis físicoquímicos realizados a las muestras utilizadas para el aislamiento de los microorganismos

Muestras	pH /25C°	Temperatura	Sólidos totales mg/l	DQO mg/l	Grasas y Aceites mg/l
Muestras líquidas					
MutISAC01	5,23	30,4	3.227	12.280	4.875
MutISAC02	5,45	29,5	2.275	8.925	4.021
MutISAC03	4,92	29,4	3.892	13.122	5.631
MutISAC04	6,12	32,5	2.380	10.660	5.102
Valor Promedio	5,43	30,4	2.943	8.848	4.907
Muestras Sólida					
MutsSAC01	6,44				
MutsSAC02	5,96				
MutsSAC03	6,33				
MutsSAC04	6,83				
Valor Promedio	6,20				

Fuente: C.I. SACEITES S.A, Laboratorio Agroecología Universidad de Santander (UDES) 2011.
Las unidades de los parámetros están dadas en (mg/l) excepto pH y T°.

Para el caso de la concentración de materia orgánica determinada en función de la DQO, Sólidos totales y contenido de Grasas y aceites, presente en las muestras de agua, también se encontraron variaciones en cada una de estas, con niveles promedio de 8848, 2943, 4907 mg/l, respectivamente. Estos valores corresponden a residuos de gomas, proteínas y ácidos grasos libres, generados en los procesos de desgomado y blanqueamiento del aceite; biomasa de los microorganismos que se mantienen activos como lodos y sólidos dentro del sistema. Los elevados niveles de grasa y aceites encontrados en las muestras de agua, se producen por vertimientos en diferentes etapas del proceso de refinación, los cuales son conducidos al efluente principal, para su tratamiento en el sistema de Trampa de grasa.

Los anteriores resultados evidencian la complejidad y el alto grado de contaminación del agua residual empleada para el aislamiento de los microorganismos, sin embargo, guardan relación con los valores reportados por Salihu y col (2012) y Fatemeh y col (2010), quienes encontraron, que el agua residual generada en las empresas de extracción o refinación de aceite de palma en Malasia, se caracteriza por presentar valores de pH bajo (4,7- 3,8), elevada concentración de materia orgánica representada como DQO (50.000 mg/l), de sólidos totales (18.000 mg/l) y de residuo de aceite (7000 mg/l). Yeong y col (2012), sostienen que el pH ácido del agua residual, generada en el procesamiento del aceite de palma, obedece a la cantidad de ácidos grasos libres que se producen al tratar el aceite crudo con compuesto químicos y que además, las variaciones en los niveles de diversos parámetros tiene que ver con el frutos que se esté procesando, la edad de este y el método empleado en la transformación del aceite.

Si bien el agua residual del sistema de Trampa de grasa, como ya se ha mencionado, presenta elevados niveles de contaminación, dicha contaminación puede favorecer la adaptación y establecimiento de algunos microorganismos, que pueden utilizar los contaminantes orgánicos como sustrato para su crecimiento y desarrollo, tal como lo señala Yeong y col (2012), quienes sostienen que por su naturaleza y composición, las aguas residuales del procesamiento de aceite permiten el desarrollo de microorganismos con actividades específicas y de utilidad industrial. Para el caso del agua residual estudiada, se puede notar que más del 50% de la materia orgánica contaminante corresponde a grasas y aceites, compuestos de lenta biodegradación.

4.1 AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS Y LEVADURAS CON POTENCIAL DEGRADADOR.

4.1.1 Aislamiento Selectivo de Bacteria y Levaduras

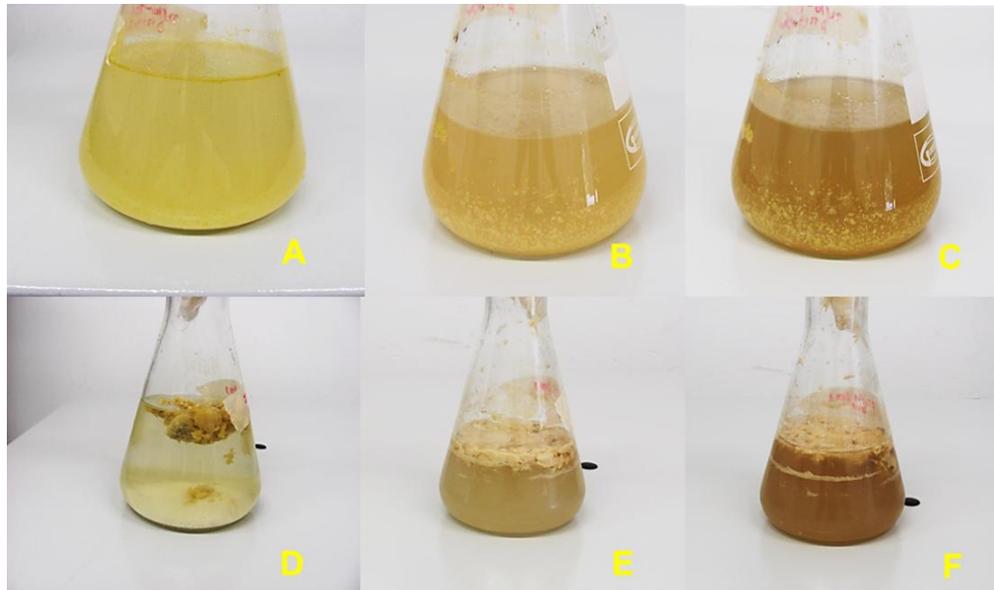
Las muestras de agua residual y residuos sólidos aceitosos se llevaron al laboratorio de Agroecología de La Universidad de Santander, para el aislamiento de los microorganismos con capacidad de degradar grasas y aceites vegetales. Inicialmente, se definió que se requería aislar microorganismos con un potencial degradador, en función de su capacidad para crecer en suspensión de medio basal de sales, utilizando como única fuente de carbono aceite. De este modo, siguiendo el procedimiento planteado por Pérez (2008), se tomaron alícuotas de las muestras y se suspendieron en medio basal de sales suplementado con aceite de palma y soya (1:1) al 0,05% p/v; los microorganismos presentes en estas suspensiones, se sometieron a una fase de preenriquecimiento de 6 - 8 días y posteriormente a una fase de adaptación durante 3 días. Tal como se muestra en la Figura 2, durante todo el proceso se observó un aumento progresivo en la turbiedad de las suspensiones y un cambio de coloración y aspecto del medio, que evidenció que en éste se daban las condiciones nutricionales adecuadas para que algunos de los microorganismos presentes desarrollaran un crecimiento significativo empleando los aceites de origen vegetal como sustrato, lo cual es un indicio no concluyente de su potencial degradador.

Aluyor, et.al. 2009, plantea que la capacidad de algunos microorganismos para crecer en un medio donde el aceite (específicamente de oliva) es la única fuente de carbono, indica que estos tienen la capacidad para transformar dicho aceite e incorporarlo a su metabolismo.

A partir de los medios de adaptación, se tomaron alícuotas (0,1 ml) y se sembraron en MBS gelificado con agar al (2% p/v) y modificado con aceite de

palma+soya (0,05% p/v) con el fin de evaluar el crecimiento de los microorganismos a través de la utilización del aceite como única fuente de carbono. En la Figura 3 se reflejan los resultados obtenidos: crecimiento de diversas colonias de diferente morfología, textura, color y aspectos etc. Estas colonias corresponden a microorganismos presentes en las muestras de agua residual y residuos sólidos aceitosos, que se mantuvieron activos luego del proceso de preenriquecimiento y adaptación

Figura 2. Evolución del crecimiento de los microorganismos durante la fase de preenriquecimiento y adaptación.



Registro fotográfico: Bayron Agualimpia V.

A Suspensión inicial de muestra de aguas residual para el aislamiento de los microorganismos
B Suspensión de muestras de aguas residual, para el aislamiento de los microorganismos, en fase de preenriquecimiento (6 días)

C Suspensión de muestra de aguas residual, para el aislamiento de los microorganismos, en fase de adaptación (3 días)

D Suspensión inicial de muestra sólida para el aislamiento de los microorganismos

E Suspensión de muestra sólida, para el aislamiento de los microorganismos, en fase de preenriquecimiento (10 días)

F Suspensión de muestra sólida, para el aislamiento de los microorganismos, en fase de adaptación (3 días)

Figura 3. Crecimiento de microorganismos en el medio basal de sales, a partir de las suspensiones de adaptación.



Registro fotográfico: Bayron Agualimpia V.

A las colonias de aspecto diferente, que crecieron en los medios sólidos modificados, se les realizó una caracterización preliminar teniendo en cuenta: su tamaño, su forma, su textura, su elevación, su color, la producción de pigmento y las características microscópicas etc. De acuerdo a estos parámetros, se logró establecer colonias diferentes con morfotipos correspondientes a grupos de Hongos filamentosos, Bacterias y levaduras.

Una vez caracterizadas las colonias diferentes, éstas se aislaron y subcultivaron en MBS modificado sólido, a fin de mantenerlas en cultivos puros. Cada uno de estos cultivos, fueron tomados como un aislamiento microbiano.

En la Tabla 5 se relacionan los Aislamientos obtenidos en los medios modificados, a partir de las diferentes muestras líquidas y sólidas. En este caso se

observa, que a partir de las muestras de agua residual, se obtuvieron un total de 14 Aislamientos (10, 3 y 1) caracterizados como: levaduras, Bacilos Gram+ y Bacilos Gram-, respectivamente; en tanto que a partir de las muestras de residuos sólidos se obtuvieron un total de 17 Aislamientos (7, 6, y 4) caracterizados como: levaduras, Bacilos Gram+ y Bacilos Gram- respectivamente. Los Aislamientos de Hongos filamentosos no se consideraron en esta investigación.

Tabla 5. Número de Aislamientos de Bacterias y Levaduras, obtenidos en los medios modificados, a partir de las muestras utilizadas.

Muestras	pH 25C°	Levaduras	Bacilos Gram+	Bacilos Gram-	Total
Muestras Líquidas					
MutISAC01	5,23	3 Aislamientos			
MutISAC02	5,45	3 Aislamientos	1 Aislamientos		
MutISAC03	4,92	2 Aislamientos			
MutISAC04	6,12	2 Aislamientos	2 Aislamientos	1 Aislamientos	
Total		10	3	1	
Muestras Sólida					
MutsSAC01	6,44	1 Aislamientos	1 Aislamientos	1 Aislamientos	
MutsSAC02	5,96	3 Aislamientos	3 Aislamientos	2 Aislamientos	
MutsSAC03	6,33	1 Aislamientos			
MutsSAC04	6,83	2 Aislamientos	2 Aislamientos	1 Aislamientos	
Total		7	6	4	

Fuente: Bayron Agualimpia V.

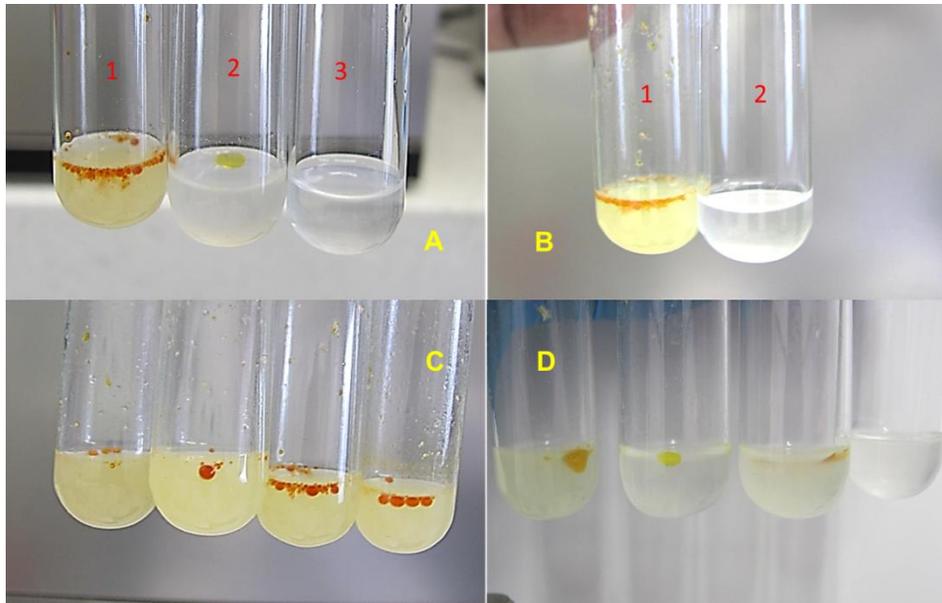
Los 31 Aislamientos obtenidos en los medios modificados permiten establecer que, si bien, el agua residual y los residuos de aceite de la empresa, tienen características fisicoquímicas complejas, estos microorganismos (levaduras, bacterias y hongos filamentosos) han logrado adaptarse a dichas condiciones, desarrollando una flexibilidad metabólica, y fisiológica que les permite crecer.

4.1.2 Selección de Bacterias y Levaduras con Potencial Degradador

Debido que el crecimiento en los medios sólidos modificados no constituía evidencia concluyente del potencial degradador, los diferentes Aislamientos se sometieron a una prueba de verificación de dicho potencial. Para esto, de cada Aislamiento se inocularon 3 colonias en tubos con MBS+ aceite al 0,05% y 3 colonias en MBS sin la adición de aceite (el control). Lugo de 48 horas de incubación se evidenció que sólo 11 de los 31 Aislamientos resultaron positivos, es decir, presentaron algún tipo de transformación o indicio de crecimiento en el medio con MBS y aceite al 0,05% y ninguna evidencia de actividad en el MBS.

En la Figura 4, se puede observar como los microorganismos con un potencial degradador generan cambios de coloración, aumento de la turbiedad y disminución de la película de aceite en los tubos de MBS+ aceite al 0,05%, al contrario de lo que sucede en los tubos con medio basal de sales, medio carentes de aceite, donde no generaron cambios. Estas variaciones determinan que, los 11 Aislamientos, tienen la capacidad de utilizar el aceite como fuente de carbono bajo condiciones in-vitro y pueden ser considerados potencialmente degradadores de grasas y aceite de origen vegetal. Para el caso de los otros Aislamientos, el crecimiento en los medios anteriores pudo estar asociado a la utilización del agar entre otros componentes diferentes al aceite.

Figura 4. Evidencia del crecimiento de los Aislamientos con potencial degradador.



Registro fotográfico: Bayron Agualimpia V.

A 1 Crecimiento de Aislamiento en medio (MBS+ aceite al 0,5%), 2 (MBS+ aceite al 0,5% sin inocular, 3 Aislamiento en MBS

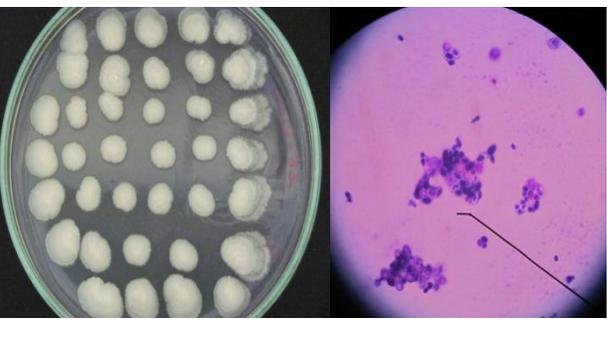
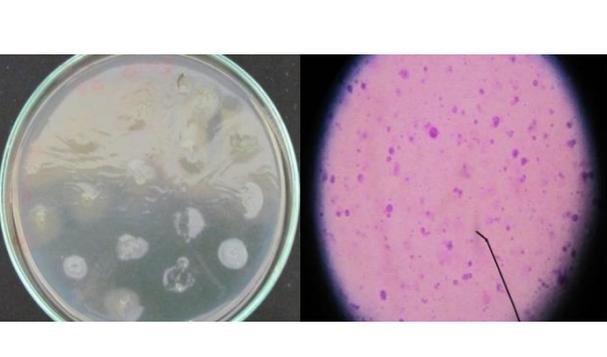
B 1 Crecimiento de Aislamiento en medio (MBS+ aceite al 0,5%), 2 Aislamiento en MBS

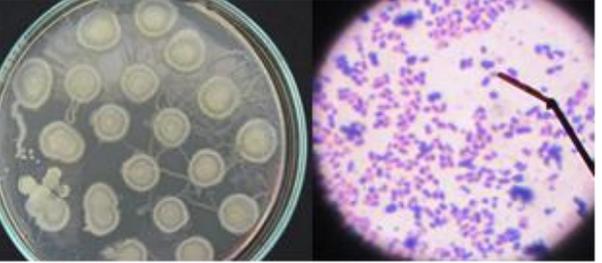
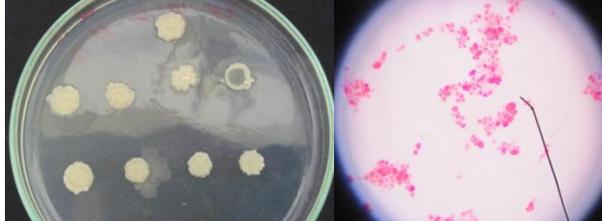
C Crecimiento de 4 Aislamiento en medio (MBS+ aceite al 0,5%)

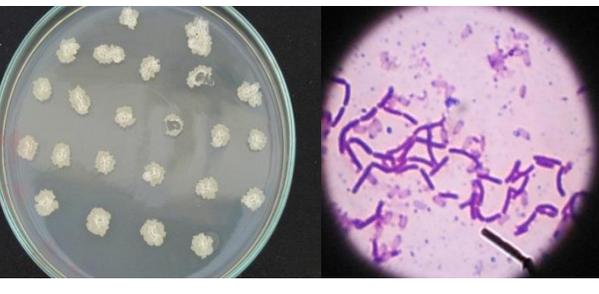
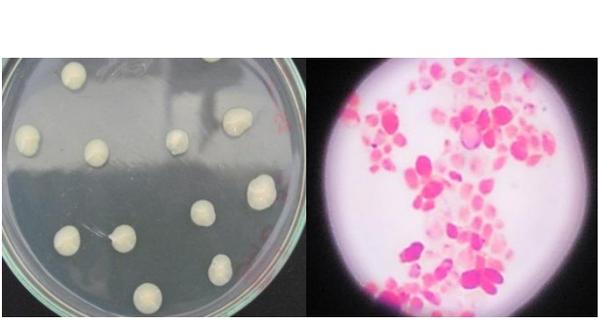
D Crecimiento negativo de 4 Aislamiento en medio (MBS+ aceite al 0,5%)

Luego de la prueba de verificación señalada, los Aislamientos con potencial degradador (11 en total) fueron codificados usando 3 letras que representan el lugar de aislamiento, seguido de L si es una levadura o B si es una bacteria, y un número entero según la secuencia de aislamiento. En la Tabla 6, se muestran las características Microscópicas y Macroscópicas de los 11 Aislamientos seleccionados como potencialmente degradadores de grasas y aceites. De éstos 8 (SACL01, SACL03, SACL04, SACL05, SACL06, SACL08, SACL09, SACL11) fueron caracterizados como levaduras y 3 (SACB02, SACB07, SACB10) como bacterias.

Tabla 6. Características microscópicas y macroscópicas de los aislamientos con potencial degradador de grasas y aceites de origen vegetal.

Aislamiento	Características Microscópicas	Características Macroscópicas	Evidencia fotográfica
SACL01	Levaduras Ovoides	Colonias grandes, borde irregular, planas, de consistencia blanda, aspecto opaco, color blanco	
SACB02	Bacilos (Gram+) endosporados	Colonias grandes, borde irregular, elevadas, de consistencia dura y color blanco	
SACL03	Levaduras Ovoides	Colonias grandes, planas, borde regular, de consistencia blanda de Aspecto transparente, color beige	
SACL04	Levaduras Cilíndrica	Colonias grandes, planas, borde regular, de consistencia dura, opaca, color blanco	

Aislamiento	Características Microscópicas	Características Macroscópicas	Evidencia fotográfica
SACL05	Levaduras Ovoides	Colonias grandes, planas, borde regular, de consistencia blanda, de color blanco	
SACL06	Levaduras Ovoides	Colonias grandes, consistencia cremosa de aspecto opaco, de color beige	
SACB07	Bacilos (Gram-)	Colonias grandes, elevadas, borde irregular, de consistencia mucoide, brillante color beige	
SACL08	Levaduras Ovoides	Colonias grandes, elevadas, borde irregular, de consistencia dura, opaca, color blanco	
SACL09	Levaduras Ovoides	Colonias grandes, planas, borde regular, de consistencia dura, opaca, color blanco	

Aislamiento	Características Microscópicas	Características Macroscópicas	Evidencia fotográfica
SACB10	Bacilos (Gram+) endosporados	Colonias grandes, borde irregular, elevadas, de consistencia dura y color blanco	
SACL11	Levaduras Ovoides	Colonias grandes, elevadas, borde irregular, de consistencia mucoide, brillante color beige	

Fuente y Registro fotográficos: Bayron Agualimpia V.

El grupo de levaduras, se caracterizó macroscópicamente por presentar colonias grandes, planas, elevadas y de borde irregular; consistencia blanda, dura o mucoide; de aspecto brillante u opaco. Para el caso de las bacterias, se encontraron colonias grandes, borde irregular, elevadas, de consistencia dura y mucoide, de color blanco y beige.

Paralelo a la caracterización macroscópica y microscópica, a los 11 aislamientos se les efectuó una identificación presuntiva mediante pruebas bioquímicas. Los resultados obtenidos de estas pruebas arrojaron que: los Aislamientos SACL05 y SACL08) pertenecen al género Yarrowia con un 72% de confiabilidad; los aislamientos SACL01, SACL 04 SACL09 pertenecen al género Candida con un 68% de confiabilidad; en tanto que los aislamientos SACL03, SACL06 y SACL11) no muestran correspondencia con géneros de levaduras. En cuanto a los aislamientos de bacterias, las pruebas aplicadas arrojaron que SACLB02 y

SABL10 corresponden al género Bacillus con un 81 % de confiabilidad y el SACB07 al género Pseudomonas con un 78 % de confiabilidad.

Estos aislamientos (identificados presuntivamente) corresponden a géneros de levaduras y bacterias que han sido reportados con capacidad para transformar y degradar grasa o aceites de origen animal, vegetal y mineral, gracias a que son productores de lipasas. (Treichel, et al. 2010), referencia los trabajos realizados por (Ciafardini, et al. 2006) en los cuales logró el aislamiento de cepas lipolíticas de Candida wickerhamii y Candida boidinii, a partir de residuos de aceite de oliva; en este mismo sentido, cita a (Kiran, et al. 2008) y (Ruchi y col. 2008) quienes lograron el aislamiento de cepas de Pseudomonas sp y Pseudomonas aeruginosa respectivamente, productoras de lipasas con halos de solubilización de 37% en agar tributirina, también a (Ertugrul, et al. 2007) que logró el aislamiento de 17 cepas empleado un medio basal de sales suplementado con residuos del procesamiento de aceite de oliva.

Al igual que estos investigadores, en este trabajo se pudo establecer que los residuos líquidos y sólidos utilizados permitieron el aislamiento de levaduras y bacterias con potencial para la degradación de grasas y aceites de origen vegetal, de tal forma que dichos residuos favorecen la actividad de microorganismos con capacidades enzimáticas específicas.

4.2 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS CON MAYOR CAPACIDAD DEGRADADORA

Una vez aplicada la prueba de tamizaje para la verificación del potencial degradador, a los 11 Aislamientos que dieron positivo a la prueba, se les determinó su capacidad para degradar grasas y aceites de origen vegetal en MBS líquido modificado. Como fuente de grasas y aceite, se adicionó al medio 2000 mg/l de aceite de palma y soya (1:1).

La evaluación de la degradación de las grasas y aceites lograda por cada Aislamientos, se realizó de manera indirecta, determinando el porcentaje de disminución de la concentración de DQO, a las 48 y 72 horas¹.

El porcentaje de disminución de la concentración de DQO, se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de disminución} = \frac{[\text{DQO}_i] - [\text{DQO}_f]}{[\text{DQO}_i]} * 100$$

Dónde:

[DQOI] Concentración de DQO inicial, en mg/l

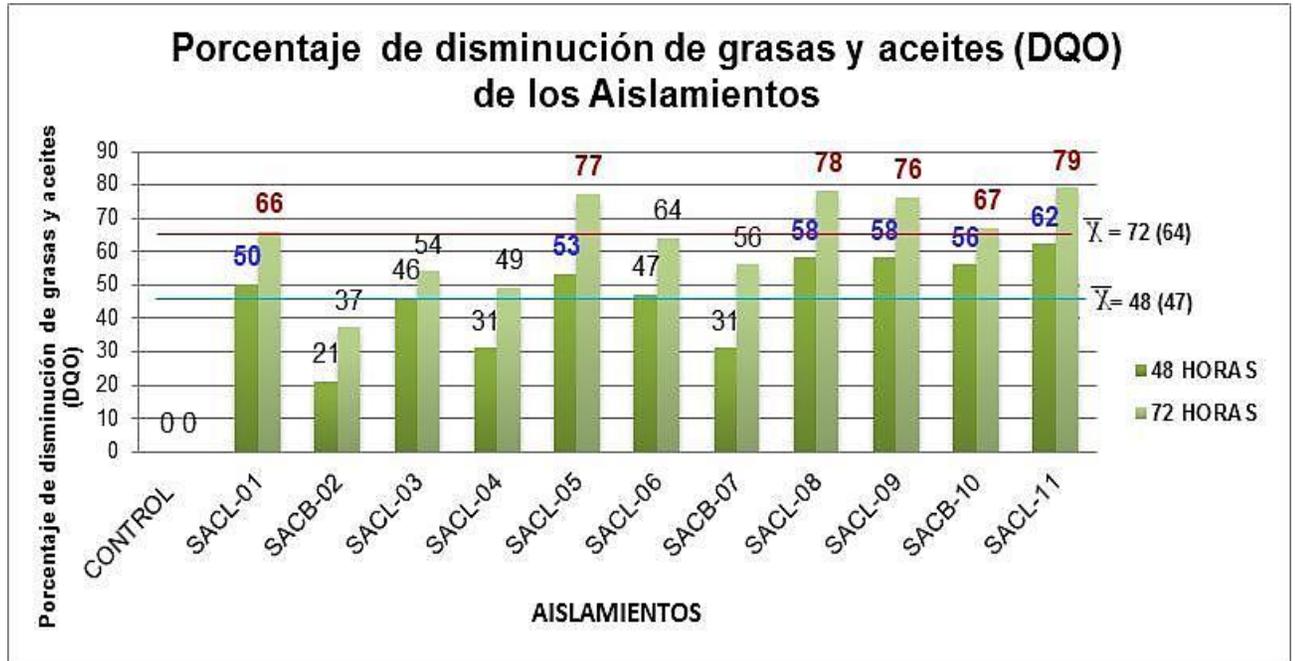
DQOf] Concentración de DQO final, en mg/l

*100 Factor de corrección porcentual

La Figura 5 muestra los diferentes porcentajes de disminución de DQO logrados por cada aislamiento a las 48 y 72 horas de evaluación. Es posible apreciar que todo ellos, generan un disminución en la concentración de la DQO, sin embargo, los aislamientos SACL01, SACL05, SACL08, SACL09, SACB10, SACL11 (5 levaduras de los y 1 bacteria) presentaron las mayores actividades degradadoras alcanzando a las 72 horas de evaluación porcentajes de disminución de la concentración de DQO del 56%, 77%, 78%, 76% y 79%, respectivamente. Los aislamientos con menor efecto fueron SACB02, SACL04, SACB07 (2 bacterias y 1 levadura) con valores a las 72 horas de 37%, 49% y 56%, respectivamente.

¹ La concentración de DQO fue tomada como una medida indirecta de la concentración de grasas y aceites, debido a que la DQO es una prueba que permite la cuantificación de la materia orgánica (entre ellas las grasas y aceites), presente en una matriz líquida. Lo anterior se corroboró a través de una curva de calibración, en la cual a diferentes soluciones de aceite de palma a concentraciones conocidas se les midió DQO, con un factor de corrección de (1,25g)

Figura 5. Porcentajes de disminución de la concentración de grasas y aceites (DQO) logrados por los 11 aislamientos, a las 48 y 72 hora de evaluación



Fuente: Bayron Aguallimpia V. Minitab v.15, Excel v2010

Los porcentajes de disminución de la concentración de DQO, alcanzado por los aislamientos SACL01, SACL05, SACL08, SACL09, SACB10, SACL11, permiten establecer que estos son capaces de transformar o degradar las grasas y aceites de origen vegetal, guardando relación con los reportados por (Fakharedine, et al. 2011), quien en experimentos realizados con Cepas del género Candida, evidencio que estas removían en aproximadamente 5 días un 80% de la grasa y aceite presentes en un medio hecho a base de residuo del procesamiento de aceite de oliva. De igual forma (Bhumibhamon, et al. 2002) estableció que cepas del genero Bacillus y Pseudomonas podían remover más del 80% de aceite de palma, al ser evaluada su capacidad bajo condiciones de laboratorio.

De otra parte, al aplicar un análisis de varianza (Pruebas de los efectos inter-sujetos) para evaluar el nivel de interacción y efectos principales entre los factores Aislamientos (11 en total) denotado como A y Tiempo de reacción denotado como B, respecto a la disminución de la concentración de DQO como variable respuesta, para un número de 72 observaciones, se encontró como se muestra en la Tabla 7 que al factor A por sí solo, es decir los Aislamientos, tiene un efecto significativo en la disminución de la DQO, por lo cual la hipótesis H0 se rechaza y H1 se acepta, es decir los microorganismos aislados tiene efectos diferentes en la disminución de la concentración de DQO. La misma tendencia ($p < 0,05$) se observa para el factor B (tiempo) y para la interacción (Aislamientos* Tiempo). Lo anterior indica que, tanto los Aislamientos obtenidos como el tiempo de reacción empleado para la evaluación de la actividad degradadora, afectan la degradación de las grasas y aceites de origen vegetal adicionado al medio de cultivo empleado.

Tabla 7. Análisis de varianza de los efectos principales: Aislamiento-Tiempo y su interacción son sobre degradación de las grasas y aceites ($p < 0,05$).

Pruebas de los efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: Disminución de grasas y aceites (DQO)					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3,263 ^a	23	,142	88,425	0,000
Intersección	18,433	1	18,433	11490,432	0,000
Aislamiento	2,672	11	0,243	151,440	0,000*
Tiempo	0,512	1	0,512	319,003	0,000*

Aislamiento *	0,079	11	0,007	4,450	0,000*
Tiempo					
Error	0,077	48	0,002		
Total	21,772	72			
Total corregida	3,340	71			

a. R cuadrado = ,977 (R cuadrado corregida = ,966)

Fuente: Bayron Agualimpia V.: SPSS v.14 Minitab v.15

*Factores estadísticamente significativos al 5%

Una vez establecido que existía un alto grado de significancia de los factores Aislamientos-Tiempo, en la degradación de las grasas y aceites, se procedió a realizar las pruebas de Comparaciones múltiples (Bonferroni)² con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre el grupo de los 11 Aislamientos con respecto al control.

Para el caso del grupo de estudio el nivel de significancia y el ajuste se realiza teniendo en cuenta la diferencia de medias de los porcentajes de disminución alcanzadas por cada Aislamiento durante las 72 horas de evaluación y tomando como estadístico la media general.

En la Tabla 8 se muestra el nivel de significancia entre los Aislamientos evaluados, los límites inferiores y superiores de los porcentajes de disminución y la diferencia entre las medias de dicha disminución.

² El test estadística de comparaciones múltiples Bonferroni permite hacer un ajuste del nivel de significación del grupo estudiado, en relación con el número de pruebas estadísticas realizadas simultáneamente, sobre un conjunto de datos. El nivel de significación para cada prueba se calcula dividiendo el error global de tipo I entre el número de pruebas a realizar.

Tabla 8. Pruebas de comparaciones múltiples

Comparaciones múltiples				
(Bonferroni)				
<i>“Proporción de la disminución”</i>				
Aislamiento	Diferencia de medias (I-J) 48h	Intervalo de confianza 95%		*
		Límite inferior	Límite superior	
SAC-L01	0,5850*	0,5018	0,6682	A***
SACB-02	0,2967*	0,2135	0,3799	B**
SAC-L03	0,5033	0,4201	0,5865	AC*
SAC-L04	0,4067*	0,3235	0,4899	D
SAC-L05	0,6483*	0,5651	0,7315	E**
SAC-L06	0,5500*	0,4668	0,6332	CF
SACB-07	0,4317*	0,3485	0,5149	BDG**
SAC-L08	0,6733	0,5901	0,7565	EH***
SAC-L09	0,6667*	0,5835	0,7499	AEHI***
SACB-10	0,6133*	0,5301	0,6965	AEHIJ***
SAC-L11	0,6967*	0,6135	0,7799	HIK***
CONTROL	-0,5850*	-0,6682	-0,5018	L***

Fuente: Bayron Agualimpia V.: SPSS v.14 Minitab v.15

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,002.

* La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Se destaca para este caso, que los aislamientos SACL01, SACL05, SACL08, SACL09, SACB10, SACL11 (que causan los mayores niveles de disminución de DQO) no presentaron entre sí diferencias significativas en su comportamiento en cuanto a disminución de la concentración de DQO pero si con los aislamiento restantes.

Los Aislamientos SACB02, SACB07 (con los menores niveles de disminución de la DQO), tampoco presentaron diferencias significativas entre sí, pero si con respecto a los otros Aislamientos.

Con base en lo anterior se seleccionaron los SACL01, SACL05, SACL08, SACL09, SACB10, SACL11, para la conformación de un Inoculo Mixto degradador de grasas y aceites de origen vegetal. SACL01 y SACL09 corresponden al género *Candida*, SACL05 y SACL08 corresponden al género *Yarrowia*, SACB 10 corresponde al género *Bacillus* y SACL11, corresponde a una levadura sin caracterización)

4.3 DESARROLLO DEL INOCULO MIXTO

Una vez seleccionados los Aislamientos de mayor capacidad degradadora, se verifico mediante pruebas antagónicas, que no existía inhibición entre ellos. Posteriormente se constituyeron siete mezclas, a las cuales se les evaluó su capacidad degradadora, con el fin de establecer el inoculo mixto.

Las mezclas se conformaron de la siguiente forma:

Mix1: SACL-01+SACL-09+ SACB-10

Mix2: SACL-01+ SACL-05+ SACL-11

Mix3: SACL-05+ SACL-11+ SACL-08

Mix4: SACL-09+ SACL-11+ SACL-08

Mix5: SACL-05+ SACL-10+ SACL-08

Mix6: SACL-09+ SACB-10+ SACL-11

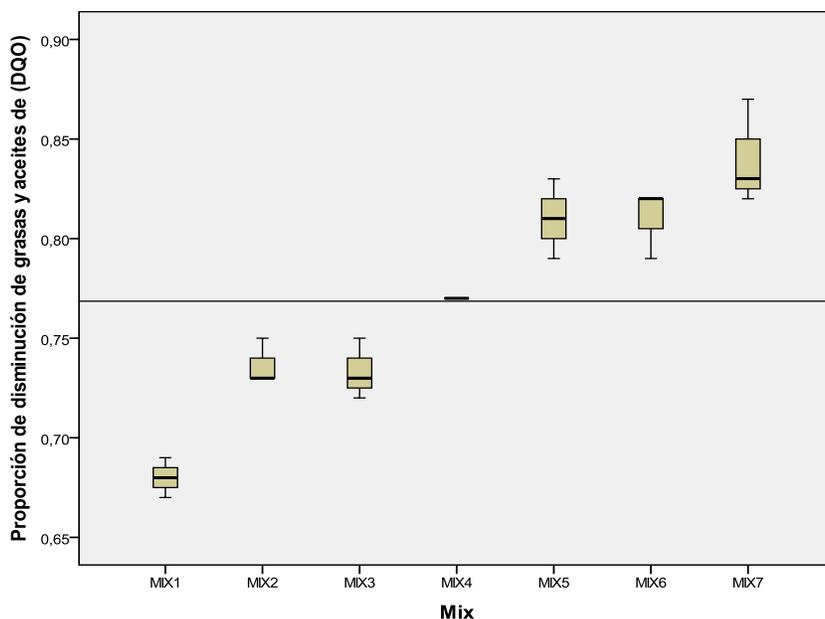
Mix7: SACL-01+ SACL-05 SACL-08+SACL-09+ SACB-10+ SACL-11

En la Figura 6, se muestra los porcentajes de disminución de la concentración de DQO, alcanzada por las diferentes mezclas al cabo de 48 horas de evaluación. Se puede evidenciar que la mezcla Mix7 conformada por los 6 Aislamientos

seleccionados presentó el mayor porcentaje de disminución de DQO, en promedio un 84%, con un máximo de 87% y un mínimo de 82%. Las mezclas Mix5 y Mix6, presentaron porcentajes de disminución ligeramente inferiores que dicha mezcla (81%), en tanto que Mix1, Mix2 y Mix3 presentaron los menores porcentajes promedio de disminución, 68%, 71% y 71 % respectivamente.

Los anteriores resultados evidencian que al mezclar los diferentes aislamientos, se mejora el porcentaje de disminución de la concentración de grasas y aceites en un valor promedio del 25%, respecto al promedio del grupo evaluado de manera individual, debido probablemente a las relaciones sinérgicas que pueden establecer los microorganismos.

Figura 6. Porcentaje de disminución de la concentración de grasas y aceites medido en términos de (DQO) alcanzado por las 7 mezclas durante 48 horas de evaluación.



Fuente: Bayron Agualimpia V.Minitab v.15

4.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEGRADADORA A PEQUEÑA ESCALA

Una vez demostrada la mayor capacidad del Mix 7 para disminuir la concentración de las grasas y aceites en el medio basal de sales, se evaluó dicha capacidad a escala de 4l, empleando agua residual de sistema de trampa de grasas.

En la Figura 7, se muestran los reactores utilizados para evaluar la capacidad degradadora del Mix 7 (junto al control), a escala de 4 litros, durante 48 horas a temperatura ambiente 27 ± 3 °C. La evaluación se realizó bajo aireación constante, para mantener la esterilidad del aire se empleó un filtro EPA de 0.45μ ; el inóculo se adicionó al 10% v/v; dentro del inóculo mixto cada aislamiento se fijó a 109 ufc/ml. Como control se empleó muestra del agua residual (4 litros) sometida a aireación constante sin la adición del inóculo.

Figura 7. Montaje piloto para evaluar la capacidad degradadora del Mix 7 a escala de 4l durante 48 horas, a 27 ± 3 °C.



Registro fotográfico: Bayron Agualimpia V.
A Reactor de control
B Reactor de Mix7

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para DQO, Grasas y Aceites y SST, logrados por Mix 7 y el control luego de 48 horas de reacción. Se evidencia que el inóculo mixto logra disminuir en un 75% la concentración de materia orgánica (relacionada como DQO) presente en el agua residual utilizada y en un 72% la concentración de la grasa y aceite presente en el agua. Sin embargo, en contraste con la disminución de la materia orgánica se muestra un aumento en la concentración de sólidos (20%) que podrá estar asociado con el aumento de la biomasa en el sistema, producto de la transformación de la materia orgánica.

En cuanto al control, tal como se ve en los resultados de la Tabla 9, se alcanza un porcentaje de disminución de la materia orgánica y de las grasas y aceites del orden del 51% y 50% respectivamente a las 48 horas. Estos niveles de disminución logrados por el control, corresponden a la actividad de los microorganismos nativos del medio, de los cuales hacen parte los microorganismos ya aislados en esta investigación.

Tabla 9. Efecto del Mix7 sobre los parámetros del agua residual y el control.

Piloto	VALORES INICIALES				VALORE FINALES :48 HORA DE EVALUACIÓN						
	Grasas		ST	pH	DQO		Grasas y Aceites		ST		pH
	DQO	y			[mg/l]	%	[mg/l]	%	[mg/l]	%	
	mg/l	Aceites	Dism	Dism]
Control	3.120	1.128	935	4,6	1.520	51	568	50	825	12	5,7
Mix 7	4.760	1.128	1.648	5.8	1.172	75	319	72	1974	-20	6,6

Fuente: C.I. SACEITES S.A; Laboratorio Agroecología Universidad de Santander (UDES) 2011; Lb CEIAM-UIS. Las unidades de los parámetros están dadas en mil. (mg/l) excepto pH

Con relación a la capacidad mostrada por el inóculo Mix7 conformado principalmente por 2 levaduras pertenecientes a los géneros Yarrowia,, 2 levaduras al género Candida, 1 levaduras sin identificar y 1 Bacteria

pertenecientes al género *Bacillus*, existen investigaciones que muestran resultados similares, ejemplo de ello son los reportes realizados por: a) (Bhumibhamon, et al 2002) quien utilizando mezclas de microorganismos nativos de aguas residuales, logró porcentajes de disminución entre el 72 y el 80%, en la concentración de grasas, aceites y en la materia orgánica (DQO), presentes en agua residual de empresas de la industria aceitera de palma, en 48 horas de evaluación; b) (Gonçalves, et, al. 2009) que reporta porcentajes de disminución de materia orgánica (DQO) entre el 30% y el 70% usando *Candida cylindracea* (CBS 7869) y *Yarrowia lipolytica* (CBS 2073, W29 ATCC 20460) y como sustrato residuos del procesamiento de aceite de oliva en aproximadamente 100 hora de reacción.

Finalmente, como resultado de la investigación se puede establecer que es posible aislar microorganismos del agua residual y residuos aceitosos sólidos, que tienen la capacidad para degradar las grasas y los aceites y demás materia orgánica en proporciones aceptables, permitiendo así tener el inóculo con actividad específica, para ser utilizado en un sistema biológico complementario al físico-químico, para el tratamiento de estos desechos en la empresa “C.I SANTANDEREANA DE ACEITES S.A y reducir la concentración de DQO. Sin embargo, se hace necesario continuar investigando para optimizar el proceso de uso de la mezcla de microorganismos aislados, especialmente en cuanto al diseño de los reactores, aumento de los tiempo de retención, incorporación de nutrientes que estimulen la actividad de los microorganismos y búsqueda de cepas termorresistente.

5. CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de 31 morfotipos de bacterias y levaduras a partir de muestras de residuos líquidos y sólidos de la empresa C.I. SACEITES S.A, los cuales mostraron capacidad para crecer en medio modificado con aceite de palma y soya, como única fuente de carbono, 14 de estos, se aislaron a partir del agua residual y 17 a partir de residuos aceitosos sólidos.

Con la metodología utilizada, a partir de los residuos sólidos y líquidos de C.I. SACEITES S.A. se llegó a la selección de 8 levaduras pertenecientes a los géneros *Yarrowia* y *Candida* y 3 bacterias pertenecientes a los género *Bacillus* y *Pseudomonas*, con potencial para la degradación de grasas y aceites de origen vegetal.

Los Aislamientos SACL01, SACL09 pertenecientes al género *Candida*), SACL 05, SACL 08 pertenecientes al género *Yarrowia*), (SACB10 perteneciente al género *Bacillus*) y SACL11 levaduras sin caracterización), presentaron la mayor capacidad para degradar grasas y aceites de origen vegetal presentes en un medio sintético.

El inóculo mixto Mix7, conformado por los 6 mejores Aislamientos con capacidad degradadora, permitió disminuir en 48 horas la concentración de DQO en un valor promedio del 84%, en medio sintético, mientras que en un medio real de aguas residuales la disminución fue del 75% DQO y del 72% para grasas y aceites.

Los resultados obtenidos en esta investigación, permiten establecer que es posible aislar microorganismos del agua residual y residuos aceitosos sólidos de C.I. SACEITES S.A, que tienen la capacidad para degradar las grasas y los aceites de origen vegetal y demás materia orgánica presente en el efluente de esta empresa ,en proporciones aceptables y bajo condiciones de laboratorio.

6. RECOMENDACIONES

Realizar la caracterización a nivel molecular de los 6 Aislamientos con mayor capacidad degradadora, a fin de garantizar que estos son inocuos y descartar que puedan ser potencialmente patógenos.

Realizar pruebas de degradación complementarias, empleado dentro del inóculo mixto, cepas de Hongos filamentosos y la estimulación con nutrientes, con el fin elevar la eficiencia en la disminución de los diferentes contaminantes.

Realizar pruebas de biodegradación con el inóculo mixto, empleando técnicas analíticas de mayor precisión, que permitan establecer la cinética de transformación de los compuestos presentes en la matriz de interés y descartar la generación de compuestos tóxicos.

Aumentar la escala del proceso de degradación con el inóculo mixto aproximadamente a 1 m³, a fin de verificar el comportamiento de esta bajo dichas condiciones.

7. BIBLIOGRAFÍA

ABRASHEV, I.; RACHEV, R.; DONEV T. A (2002) Biodegradation Activity of Microbial Associations. J. Cult. Collect 3(ABRASHEV):, 43- 47

ALTAN A. (2004) Isolation and Molecular Characterization of Extracellular Lipase and Pectinase Producing Bacteria from Olive Oil Mills Department: Biotechnology and Bioengineering Major: Biotechnology A Dissertation Submitted to the Graduate School in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of MASTER OF SCIENCE Disponible en:

<http://library.iyte.edu.tr/tezler/master/biyoteknoloji/T000497.pdf> Revisado el 3 de Mayo del 2011

ALUYOR, E. O.; OBAHIAGBON, K. O.; ORI-JESU M. (2009) Biodegradation of vegetable oils: A review, Department of Chemical Engineering, University of Benin, Benin City, Nigeria. Scientific Research and Essay Vol.4 (6), pp. 543-548 Disponible en. <http://www.academicjournals.org/SRE> Revisado el 4 de Mayo del (2011)

BAHRUDDIN, S.; WAN, T.W.; BOEY P.L (2008). Comparative Study on Oxidative Decomposition Behavior of Vegetable Oils and Its Correlation with Iodine Value Using Thermogravimetric Analysis.

BHUMIBHAMON, O.; KOPRASERTSAK, A.; FUNTHONG, (2002) Biotreatment of High Fat and Oil Wastewater by Lipase Producing Microorganisms Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand Kasetsart J. (Nat. Sci.). 36 : 261 – 267

BAUER, A.W.; KIRBY, M.M.; SHERRIS, J.C; TRUCK M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*; 45:493-6

BOGAERTS, L (1990) Ester: Performance oleochemicals for food and industrial usage. En: *Proceedings of the 1990 AOCS: World Conference on Oleochemicals into the 21st Century*. Thomas H. Applewhite (ed.), Kuala Lumpur,. 251-255.

CHAUX, G.; ROJAS, G. L; BOLAÑOS, L (2009) Cleaner production and feasibility of biological treatment for slaughterhouses effluents in small towns case: municipality of tambo (Colombia) Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca. Grupo de Investigación en Ingeniería Ambiental GIIA. Vol 7 No Disponible en:

<http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol7/PRODUCCION%20MAS%20LIMPIA.pdf> Revisado el 4 de Mayo del 2011

CIAFARDINI, G., ZULLO, B. A., & IRIDE, A. (2006). Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, 23,60 –67

D' ANNIBALE, A., BROZZOLI, V., CROGNALE, S., GALLO, A. M., FREDIRICI, F., & PETRUCCIOLI, M. (2006). Optimisation by response surface methodology of fungal lipase production on olive mill wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 1586 –1593.

EPA Emission Standards for Hazardous Air Pollutants: Solvent Extraction for Vegetable Oil Production. Federal Register 12 de abril de 2001. Washington, DC:.. Disponible en: <http://www.epa.gov/EPA-AIR/2001/April/Day-12/a8801.htm> Revisado el 22 de Marzo del 2011

ERTUGRUL, S., DONMEZ, G., & TAKAÇ, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149, 720–724

FATEMEH, P.R; PRATAP, R.S; HAKIMI, M.I; ESA, N (2010) Review of Current Palm Oil Mill Effluent (POME) Treatment Methods: Vermicomposting as a Sustainable Practice. *World Applied Sciences Journal* 11 (1): 70-81. © IDOSI Publications

FERNANDEZ, S.J.M (2005) Estructura y función de los lípidos: Grasas animales, vegetales y marinas. Disponible en:
<http://www.ual.es/docencia/jfernand/ATA/Tema4/Tema4-Estructura y Funcion Lipidos.pdf> Revisado el 3 de Mayo del 2011.

HAS, M.S; YACOB, S Treatment of Palm Oil Wastewaters 2006. University Putra Malaysia, Serdang, Malaysia Yos hihito Shirai Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu, Japan Yung -Tse Hung Cleveland State University, Cleveland, Ohio, U.S.A

GONÇALVES C; LOPES M; FERREIRA J P; BELO I (2009) Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts IBB – Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710–057 Braga, Portuga Bioresource Technology (100) pp.3759–3763

HERMOSILLA, D.E; SAN MARTÍN, C.O; VIDAL, G.S (2008) Integral Liquid Waste Management: Case Study Of A Fish Oil Refining Plant

KIRAN, G. S., SHANMUGHAPRIYA, S. , J AYALAKSH MI, J ., SE LVIN, J ., GANDHIMATHI, R., SIVARAMAKRISHNAN, S (2008). Optimization of extracellular

psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31, 483–492. D

LAN,W.; GANG, G.; JINBAO W. 2009 Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. *Journal of Environmental Sciences*. (21) pp. 237–242

LI, Z.; WRENN, B. A.; VENOSA, A. D. (2005) Anaerobic biodegradation of vegetable oil and its metabolic intermediates in oil-enriched freshwater sediments. *Biodegradation*..16(4): 341-352.

ŁOBOS, E. M; DUDZIAK, M; ZOŃ, Z (2009) Biodegradation of rapeseed oil by activated sludge method in the hybrid system Faculty of Energy and Environmental Engineering, Silesian University of Technology, ul. Konarski ego 18, Gliwice 44-100, Poland

MACRIS, J.B.; E. KOURENTZI D.G.. (1996) Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. *Process Biochem*. 31(8): 807-812.

MANSEE, A.H.; MONTASSER M. R.; SHANAB, A.S.A. (2004) Decontamination of Pollutants in Aquatic System: 1. Biodegradation Efficiency of Isolated Bacteria Strains from.

MELIKE., Y. K; KADIR K; GONCA, K U. (2008) Physico-chemical Treatability of Olive Mill Wastewater (OMW) University, Faculty of Engineering and Architecture. Department of Environmental Engineering / BURSA

MUÑOZ, M. D (2005) System of residual water treatment of slaughter house: for a smaller population 2000 inhabitants Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad del Cauca, Popayán. Grupo de investigación en Diseño, Proceso y Energía Disponible en

<http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol3/Art312.pdf> Revisado el 4 de Mayo del 2011

NWUCHE, C.O.; OGBONNA, J C. (2011) Isolation of Lipase Producing Fungi from Palm Oil Mill Effluent (POME) Dump Sites at Nsukka Department of Microbiology; University of Nigeria Vol.54, n. 1: pp. 113-116

ORTEGA, T.J.A ; PALACIOS, S. O. Y; RINCÓN, N.P.C (2008) Sulfonación de ésteres metílicos derivados del aceite de palma Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 9 (2), 77-87

PÉREZ, S .R. M; CAMACHO, P. M. I. GÓMEZ, M.J.M; Ábalos, R. A; Viñas, M.; Cantero, M D (2008) Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 39, No. 1

PÉREZ, S .R. M; CAMACHO, P. M. I. GÓMEZ, M.J.M; ÁBALOS, R. A; VIÑAS, M.; CANTERO, M D (2008) Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 39, No. 1

RUCHI, G., ANSHU, G., & KHARE, S. K. (2008). Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application . *Bioresource Technology*, 99 , 4796 – 4802.

SAIFUDIN, N.; CHUA, K.H (2006) Biodegradation of Lipid-rich Waste Water by Combination of Microwave Irradiation and Lipase Immobilized on Chitosan.” *Biotechnol.* 5 (3): 315- 323.

SALIHU, A; ZAHANGIR, A. M. (2012) Palm oil mill effluent: a waste or a raw material? *Journal of Applied Sciences Research*, 8(1): 466-473, Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/b853w434324r034l/fulltext.pdf>

SALIHU A.; ALAM M. Z; ABDULKARIM M.I; S. M. (2011) Suitability of using palm oil mill effluent as a medium for lipase production *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(11), pp. 2044-2052

TORRES, C. R. 2012 XL CONGRESO NACIONAL DE CULTIVADORES DE PALMA DE ACEITE Informe de labores del Fondo de Fomento Palmero Director de Planeación y Desarrollo Económico Sectorial Fedepalma Bucaramanga,

TORRIJOS, M.; KUMAR, A.T; SOUSBIE, P; BOSQUE, F; DELGENÉS J. P. 2008 Anaerobic digestion of residues from production and refining of vegetable oils as an alternative to conventional solutions. *Water Science & Technology—WST* | 58.9

YEONG, T.W; WAHA, A. M; JAHIM, J.M.; ANUAR, N (2010) Pollution control technologies for the treatment of palm oil mill effluent (POME) through end of pipe processes. *Journal of Environmental Management* 9.

8. ANEXOS

Anexo A: CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS 11 AISLAMIENTOS CON POTENCIAL DEGRADADOR

Figura 8. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL01 durante 36 hora de medición.

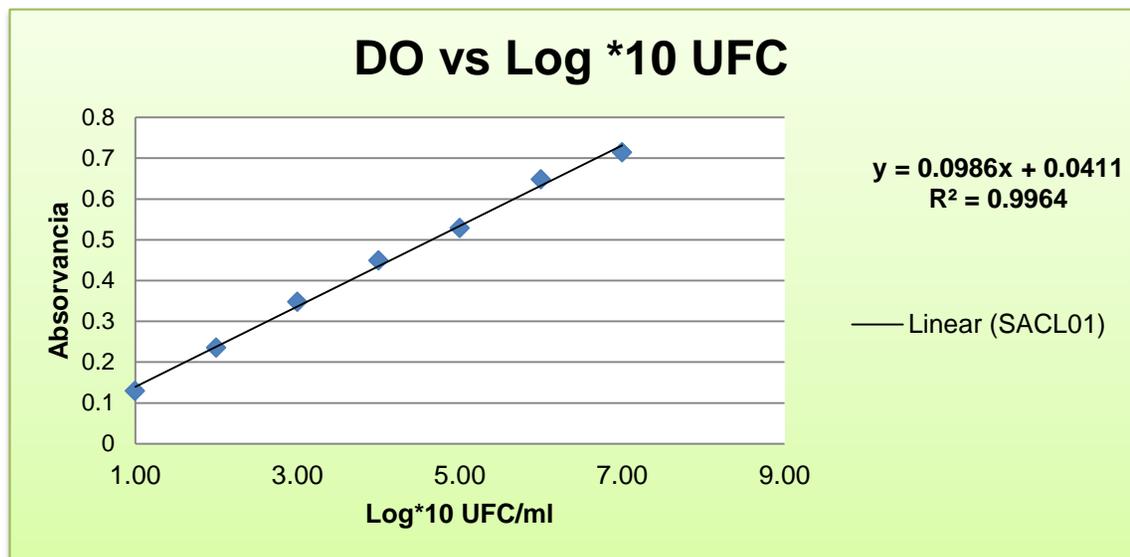


Figura 9. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACB02 durante 24 hora de medición.

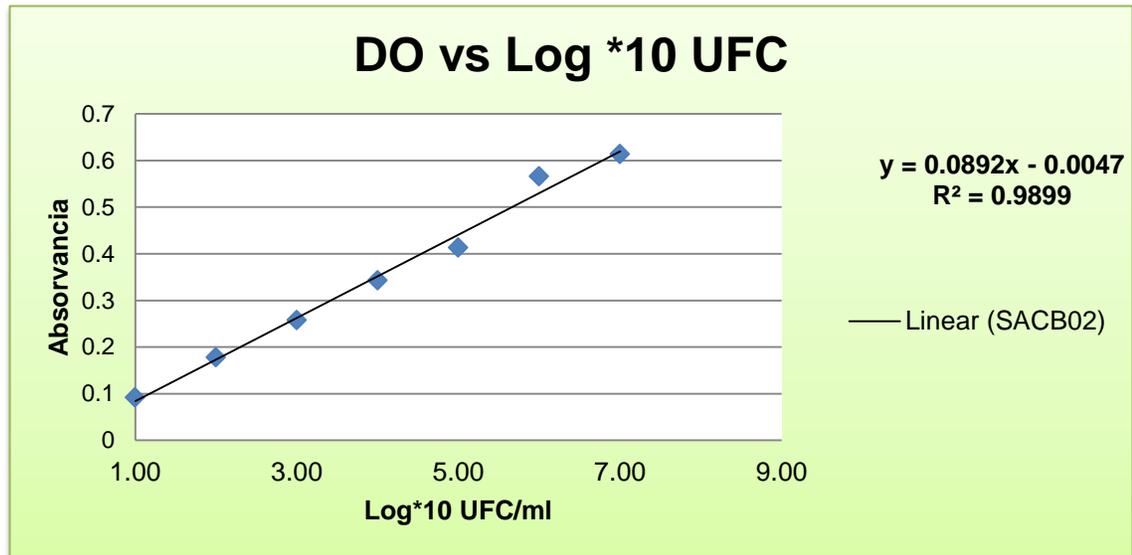


Figura 10. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL03 durante 36 hora de medición.

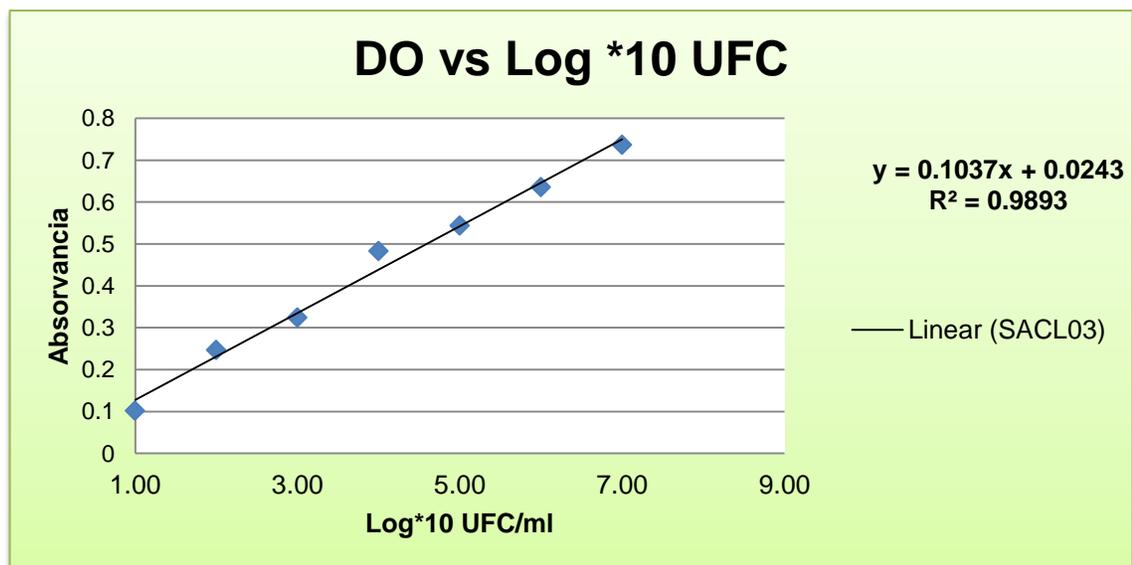


Figura 11. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL04 durante 36 hora de medición.

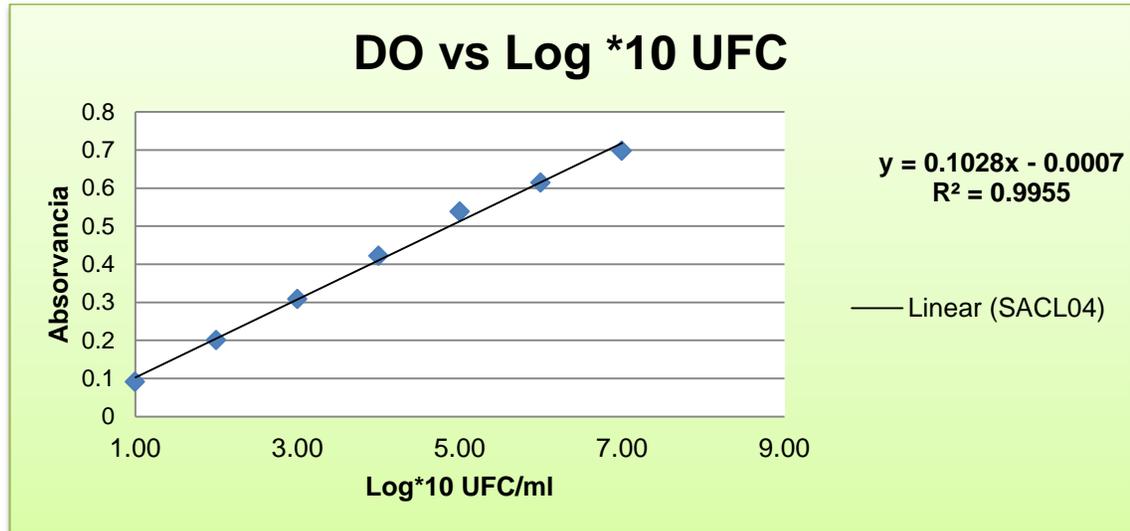


Figura 12. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL05 durante 36 hora de medición.

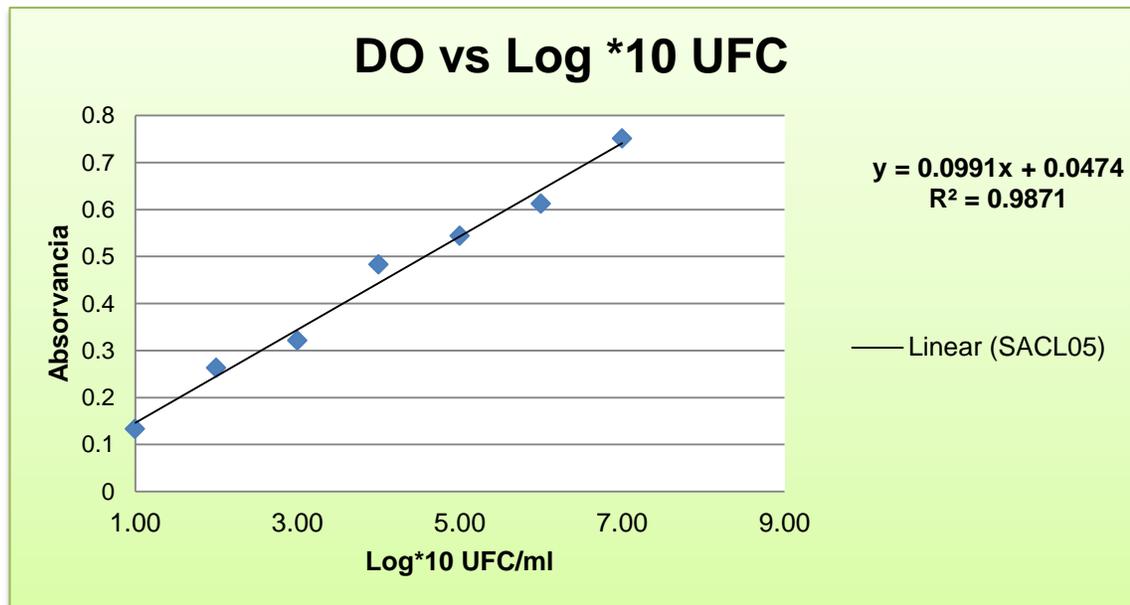


Figura 13. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL06 durante 36 hora de medición.

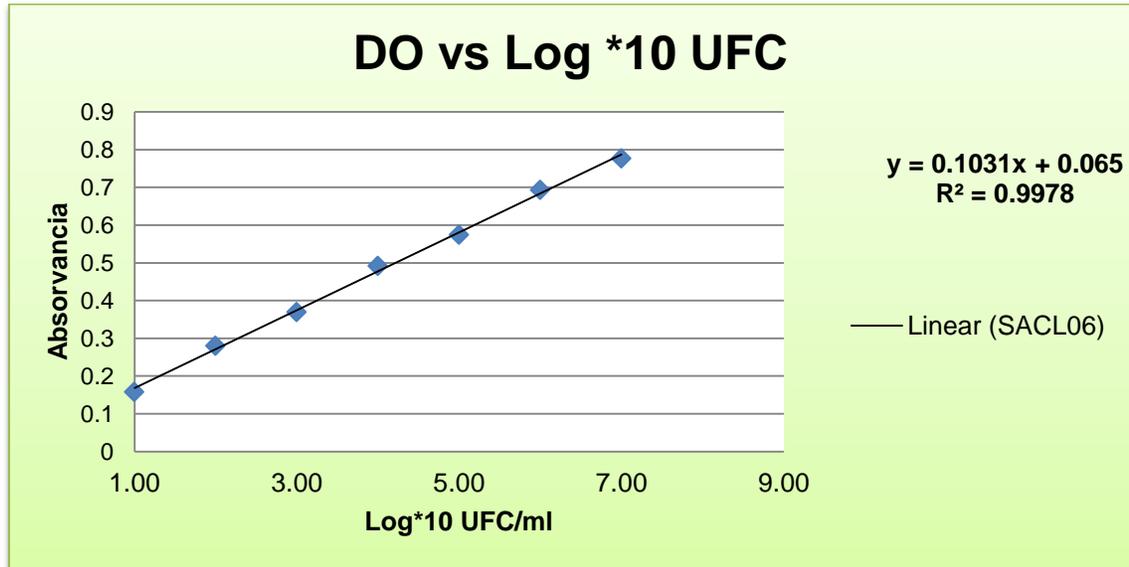


Figura 14. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACB07 durante 24 hora de medición.

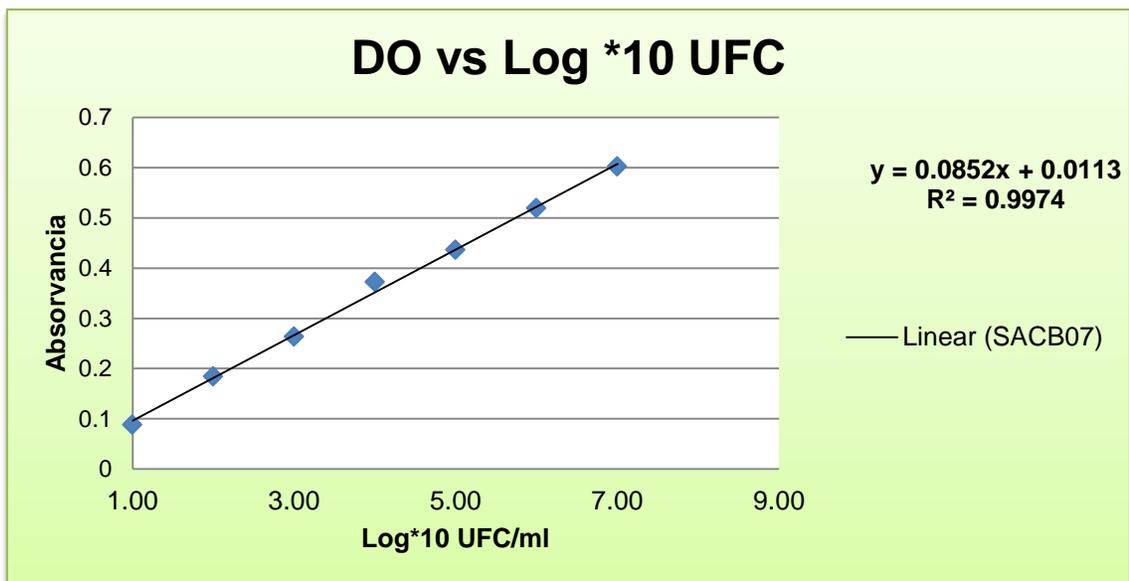


Figura 15. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL08 durante 36 hora de medición.

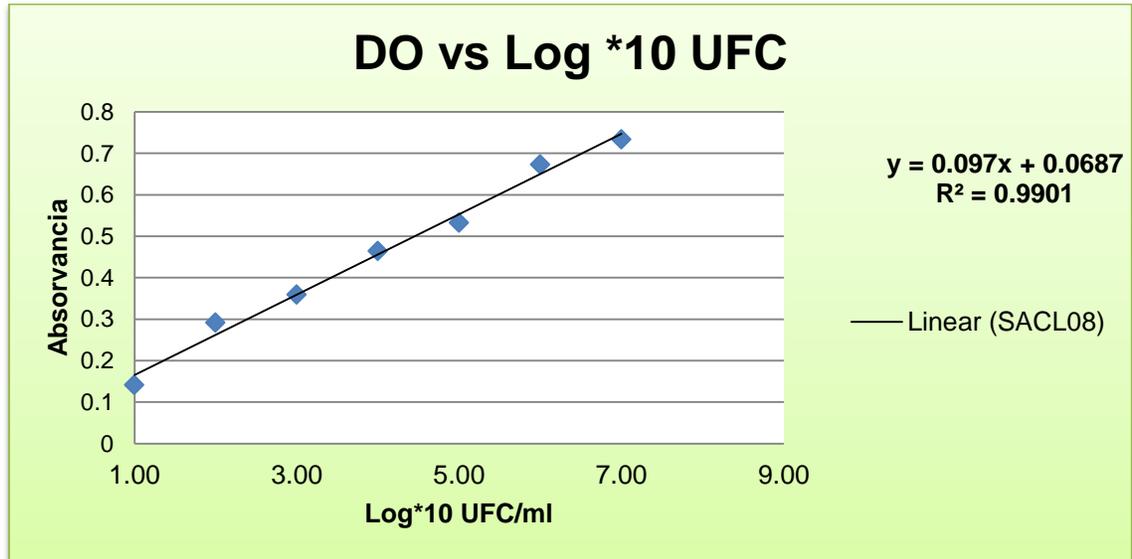


Figura 16. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL09 durante 36 hora de medición.

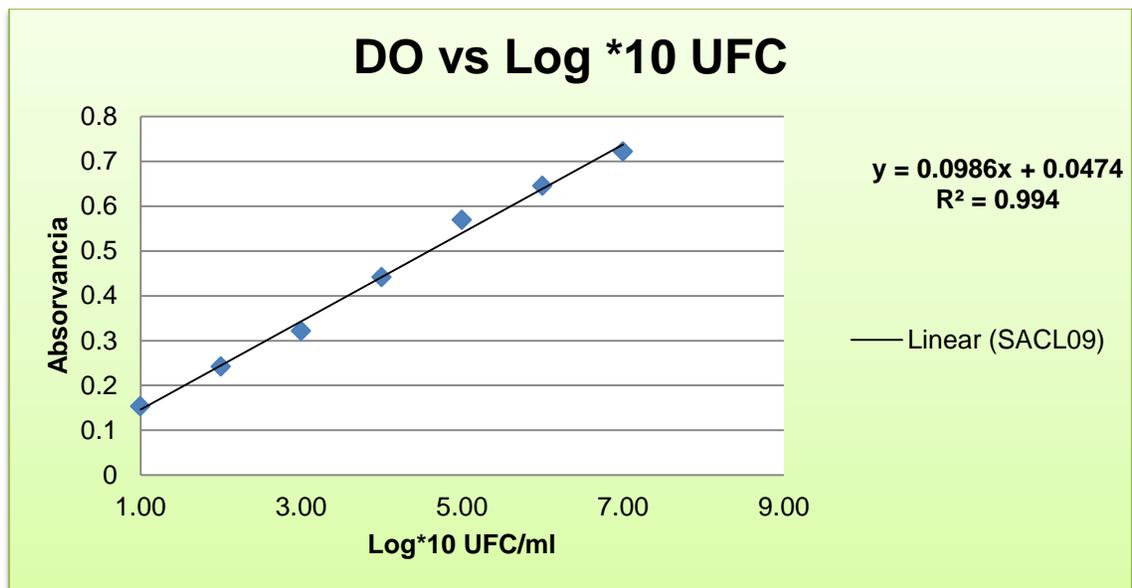


Figura 17. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACB10 durante 24 hora de medición.

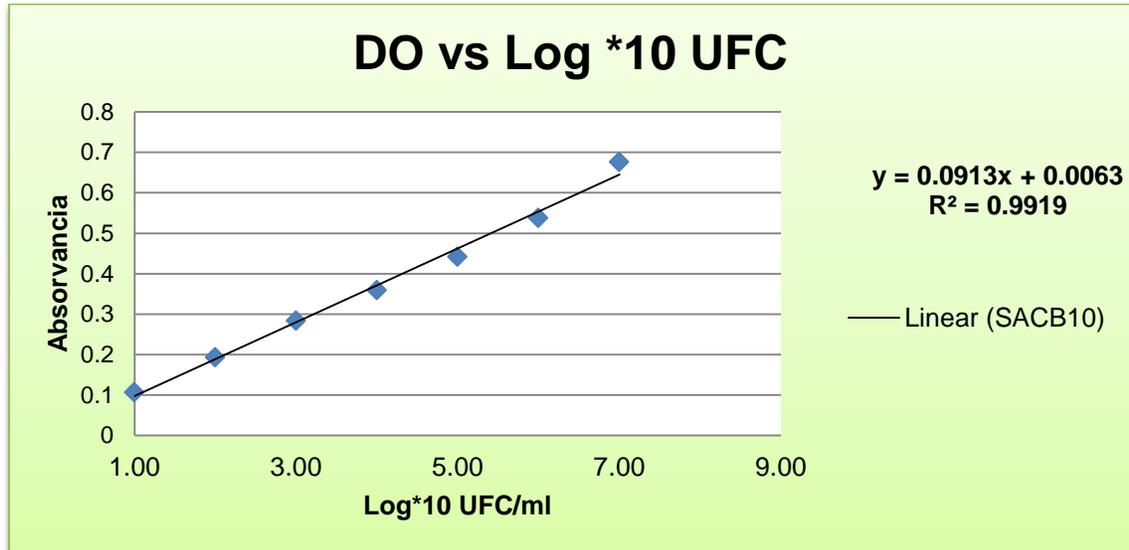
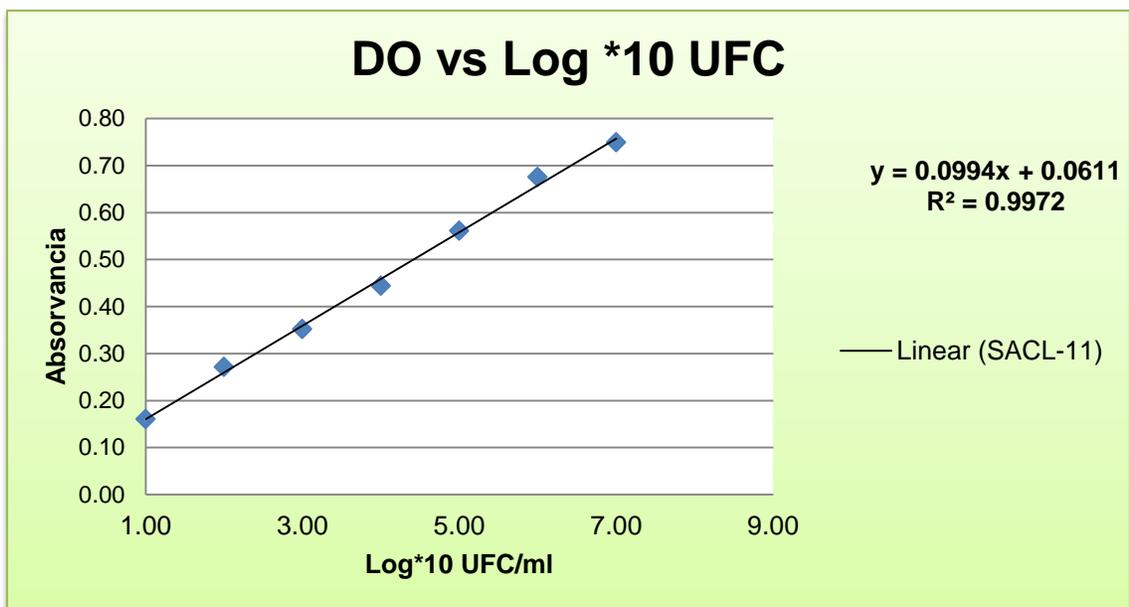


Figura 18. Curva de crecimiento (densidad óptica (nm) vs UFC) del aislamiento SACL11 durante 36 hora de medición.



Anexo B: ETAPAS Y RESIDUOS DEL PROCESOS DE REFINACIÓN DE ACEITE DE PALMA

Figura 19. Residuos generados en las etapas del proceso de refinación química de aceite de palma

