

# Evaluación de la capacidad degradadora de aceite por bacterias lipolíticas en el lodo residual de la extracción de aceite de palma

## Evaluation of the oil degradation capacity of lipolytic bacteria in the residual sludge of the oil palm extraction

M.F. Otálora <sup>1</sup>; J.L. Peña <sup>1</sup>; M.M. Martínez <sup>2</sup>; A. Varela <sup>2</sup>

### RESUMEN

Las lagunas de estabilización son sistemas de tratamiento de efluentes que emplean microorganismos especializados para la depuración de los residuos. Uno de los problemas de manejo que presenta este tipo de residuos en las plantas extractoras de aceite de palma es la alta carga de aceites y grasas residuales (aproximadamente 8.750 mg/l.). La remoción de estas grasas puede realizarse mediante la preparación de un cultivo biológico lipolítico, el cual tome las grasas presentes en el residuo, las metabolice y permita aprovechar los nutrientes, minerales, carbohidratos y proteínas. En este estudio, realizado en la Plantación Palmar del Oriente (Villanueva, Casanare), se aislaron cepas nativas con actividad lipolítica de cada una de las lagunas de estabilización 1 A (14,8%); 1 B (24,07%); 2 (27,77%); 3 (12,96%); y 4 (20,37%). De estas cepas se seleccionaron seis, las cuales presentaron mayor actividad, tres pertenecientes al género *Pseudomonas*, una al género *Enterobacter*, otra al género *Bacillus* y otra al género *Staphylococcus*. Con estas cepas se preparó un inoculo y se realizaron pruebas en campo evaluando la remoción de grasas y aceite a partir de 8 tratamientos diferentes en volúmenes de 60 y 2 litros, incluyendo un tratamiento control. Simultáneamente se evaluó la degradación del aceite bajo condiciones controladas en un reactor de 5 litros, el cual se mantuvo en aireación constante; a todos estos ensayos se les realizaron mediciones de pH, temperatura y porcentaje de aceite y grasas (mg/l); con respecto a este último parámetro se analizó el contenido inicial (tratamiento control) a los 8, 15 y 30 días durante un período de un mes. El inoculo mixto de bacterias logran remover, como máximo, el 40% del aceite en el ensayo con canecas de 60 litros en un tiempo de 15 días a una temperatura de 33°C y pH de  $7,0 \pm 0,2$ ; y un 20% de remoción de aceite se obtuvo con el ensayo en un reactor de 5 litros (bajo condiciones controladas).

### SUMMARY

Stabilization ponds are biological wastewater treatment systems, in which specially adapted microorganisms are essential. In palm oil mills, one of the most important problems associated with stabilization ponds is the high content in residual oils and lipids (approximately 8.750 mg/l). The removal of lipids and oils using a lipolytic bacteriological culture would generate a liquid with enough nutrients (minerals, carbohydrates and proteins) that could have other end uses, such as soil fertilization. This study was carried out at Palmar del Oriente (Villanueva, Casanare). Several native strains with lipolytic activity were isolated from the stabilization ponds 1 A (14.8 %); 1 B (24.07 %); 2 (27.77 %); 3 (12.96 %) and 4 (20.37 %). Among them six, belonging to the genera: *Pseudomonas*

- 1 Profesores. Depto. de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.
- 2 Estudiantes. Depto. de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

, *Enterobacter*, *Bacillus* and *Staphylococcus*, were selected based on their greater lipolytic activity. Afterwards, amixed culture with these strains was prepared and tests were conducted in laboratory and on field, assesing lipid removal in 8 different treatments in 2 and 60 lts, including a control treatment. At the same time lipid degradation was assesed under strictly controlled conditions, in a 5 liter reactor, with constant aeration; pH, temperature, and lipid content (mg/l), were measured in all assays. Lipid content was measured at days 0, 8, 15 and 30. The higher percentage of oil removal in the assay rehearsal with 60 lts was 40% in 15 days at 33°C and pH of  $7.0 \pm 0.2$ . A 20% removal of oil was obtained with the assay in a reactor of 5 lts (under controlled conditions).

Palabras claves: Aceite de palma. Aguas residuales. Lagunas de estabilización. Tratamiento de aguas residuales, Bacterias lipolíticas, Biorremediación, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp.

## INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de extracción de aceite de palma se realizan varios pasos importantes que incluyen el descargue de los racimos de fruta fresca, el desfrutado y, posteriormente, el procesamiento de los frutos sueltos.

El prensado de la masa de fruta se realiza por medio de una prensa de tornillo que funciona continuamente. Los pasos subsiguientes son el desarenado, la decantación, la separación de sólidos residuales, tales como el agua y el remanente de aceite .

La descarga de aceite obtenida se transporta a un secador al vacío, y el aceite seco se bombea a través de la unidad de enfriamiento al tanque de almacenamiento (Dupjohann 1994).

En el proceso de extracción de aceite de palma existen puntos de producción de aguas residuales, tales como: aguas lodosas provenientes de la clarificación, los condensados de esterilización y los efluentes de los hidrociclones.

Todos estos efluentes reciben diferentes tratamientos, de los cuales el más importante es en las lagunas de estabilización (García et al. 1995). Sin embargo, la falta de un diseño apropiado, el desconocimiento de los procesos de degradación y el complejo manejo de éstos, han hecho que en la mayoría de los casos los sistemas se saturen rápidamente y no cumplan con los objetivos deseados. Hace aproximadamente tres años se planteó la necesidad de mejorar el

tratamiento de los efluentes con un aprovechamiento interno del recurso, es decir, buscando disminuir los altos costos de un tratamiento que se vierte al desagüe con su posible reutilización.

Los problemas de manejo de este tipo de residuos radican en la elevada temperatura, pH bajo y alta carga de sólidos suspendidos y volátiles, grasas y aceites residuales, siendo su composición muy constante, lo cual permitiría un tratamiento definido como es la remoción aeróbica del material graso presente en estos residuos, después de pasar por un tratamiento anaeróbico que remueva la materia orgánica; esto a partir de un cultivo biológico lipolítico aislado del agua residual, el cual tome las grasas allí presentes, las metabolice y permita aprovechar el alto contenido de materia nitrogenada, minerales y proteínas allí contenidas en procesos de fertilización agrícola.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de aguas residuales para este trabajo se obtuvieron de las lagunas de estabilización 1 A, 1 B, 2, 3 y 4 de la planta extractora de Palmar del Oriente. Las muestras se transportaron en frascos de vidrio y se mantuvieron refrigeradas hasta el momento de procesarlas. Posteriormente se sembraron en medios de cultivo no selectivos, a partir de los cuales se recuperaron 55 cepas.

## Aislamiento y selección de cepas bacterianas

A partir de las cepas recuperadas en los medios no selectivos, las colonias aisladas se sembraron en medios selectivos como agar King B y agar F Pseudomonas con el fin de seleccionar las de interés y observar sus características morfológicas y bioquímicas.

Las bacterias que presentaron mayor actividad lipolítica en agar tributirina se enviaron al Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC) de la Universidad de los Andes, en Bogotá, D.C., para su respectiva identificación de género y especie.

## Siembra en agar tributirina

Las cepas aisladas de los medios selectivos se sembraron además en agar Tributirina para hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas de las bacterias lipolíticas y así seleccionar las cepas que formarían parte del inóculo. La selección se hizo con base en el halo de lipólisis (mayor de 2,5 cm) formado a 37 °C en un tiempo de 48 - 72 horas.

La siembra se realizó por punción, con el fin de poder medir más fácilmente el diámetro de los halos formados por éstas en el medio.

## Pruebas de antagonismo

A partir de las cepas desarrolladas en agar Tributirina, con formación de halo, se realizó una prueba de antagonismo por el método de difusión en agar (Gauze en 1965).

En cada caja de Petri se colocaron tres anillos de vidrio equidistantes, identificados con los códigos asignados a las bacterias; uno de los anillos lleva agua destilada estéril como control negativo de la prueba. Se colocó un volumen de 0,8 ml de la suspensión con una concentración por  $25 \times 10^8$  UFC/ml. Posteriormente se incubaron las cajas de petri por 24 horas a 37°C.

## Curva de crecimiento

Esta prueba se hace como complemento de la prueba de antagonismo, para conocer el tiempo de desarrollo de los microorganismos aislados y

que alcancen la fase logarítmica en tiempos similares permitan la preparación de un *inoculo* que se evaluará posteriormente.

En el tubo 1 de Mc Farland que contiene 300 microorg/ml, se sembraron en caldo nutritivo cada una de las cepas escogidas, siendo ésta la concentración de la fase de retardo; los microorganismos se llevaron a incubación a 37°C, realizando lecturas cada hora hasta las 24 horas y luego cada 24 horas hasta cuando alcanzaran la fase logarítmica de crecimiento en el espectrofotómetro a 615 nm., comparando con un patrón estéril como blanco.

## Evaluación de actividad lipolítica a diferentes volúmenes

- *Ensayo en reactor (5 litros):*

Con las cepas escogidas se aplicó el inóculo mixto con una concentración de  $54 \times 10^8$ , en 5 litros del agua residual proveniente de la laguna 2 de Palmar del Oriente, con el fin de saber si degradaban el aceite allí contenido.

Esto se realizó en un erlenmeyer de 5 litros con desprendimiento lateral en la base y con aireación constante, a una temperatura de 37°C.

A partir de muestras de 1 litro se realizaron análisis fisicoquímico de grasas y aceites a los 8, 15 y 30 días, método infrarrojo con dos repeticiones, y se compararon con el contenido inicial de estos componentes en el agua residual.

- *Ensayo de 60 litros en campo*

Este ensayo se realizó con el fin de simular las condiciones reales bajo las cuales van a actuar las bacterias en campo. Para esto se probaron diferentes tratamientos con dos repeticiones.

### Tratamientos

- T1 Agua residual de la laguna 2 (control)
- T2 Agua residual de la laguna 2 + bacteria
- T3 Agua residual de la laguna 2 + bacteria + nutriente
- T4 Agua residual de la laguna 2 + nutriente (control)

- T5 Agua residual de la laguna 2 + Bacteria + Tensoactivo
- T6 Agua residual de la laguna 2 + Tensoactivo (control)
- T7 Agua residual de la laguna 2 + Bacteria + Tensoactivo + nutriente
- T8 Agua residual de la laguna 2 + Tensoactivo + nutriente

Este ensayo se realizó en bandejas plásticas de 60 litros de capacidad, utilizando un volumen de 60 litros de agua residual de la laguna 2; las bandejas se inocularon con 2 ml/l de la mezcla de las bacterias con una concentración de  $12 \times 10^{10}$ ; a los tratamientos T5, T6, T7, T8 se añadió tensoactivo (Tween 80) al 10% en una proporción de 3ml/l como emulsificante. A los tratamientos que contenían nutriente (T3, T4, T1, T8) se les añadió 2ml/l de una solución de microelementos compuesta por  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$ , NaCl,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , Dayamineral.

El tiempo de duración del ensayo fue de un mes, realizando mediciones de pH y temperatura dos veces por semana y análisis del contenido de grasas y aceites a los 15 y 30 días, con previo análisis del contenido inicial de aceite (por infrarrojo). Además se realizaron recuentos microbiológicos en agar Tributirina cada 8 días durante 30 días.

- *Ensayo en galones (2 litros):*

Paralelo al ensayo anterior, en 2 litros del agua residual sin esterilizar se aplicaron los mismos tratamientos, manteniéndolos a una temperatura de 37°C durante 1 mes con aireación (bomba aireadora) permanente.

Se midieron los mismos parámetros de temperatura, pH y recuentos microbiológicos en agar Tributirina, así como el contenido de grasas y aceites a los 15 y 30, días con previo análisis del contenido inicial de aceite.

Los modelos estadísticos usados para el ensayo del reactor de 5 litros fueron Kolmogorov Smirnov, un análisis de varianza de una sola vía y una prueba a posteriori de Tukey.

En el ensayo con canecas de 60 litros, los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-

Wallis y un análisis a posteriori de Tukey y Chi Cuadrado ( $\chi^2$ ).

Para el ensayo de galones de 2 litros se realizaron tres repeticiones, tomando muestras cada 15 días, durante 30 días. Los datos de los tratamientos evaluados en el ensayo se analizaron mediante análisis de varianza, prueba de LSD y la prueba de Friedman.

Las variables a evaluar fueron :

- pH
- Temperatura en °C (Para los ensayos del reactor de 5 litros y galones de 2 litros la temperatura se mantuvo en 33°C).
- Contenido de grasas y aceites en ml/l.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento y caracterización de cepas

De las 24 muestras analizadas se recuperó la mayor cantidad de microorganismos de la laguna 2, aislando 32 tipos de cepas bacterianas diferentes en agar nutritivo; en agar King B, 13 y en agar F Pseudomonas, 10 tipos

La población bacteriana fue más alta en la laguna 2, con un 27,77%, comparada con las lagunas 1 A y 1B con un 14,8 y 24,07%, respectivamente. Esto se debe a que estas lagunas son anaerobias, y por lo tanto la metodología aerobia utilizada no permitió su recuperación. La laguna 2 presenta un pH 7,2, la temperatura y los nutrientes necesarios para que los microorganismos aerobios se desarrollen allí. Además, el contenido de grasas y aceites que presenta no es tan alto en las dos primeras lagunas (aproximadamente un promedio de 14.385 mg/l) ni tan bajo como en las últimas (trazas de aceite).

En las lagunas 3 y 4 se recuperaron menos microorganismos posiblemente por el bajo contenido de nutrientes que éstas presentan y el alto pH en el que se encuentran.

Muchos microorganismos encontrados podrían pertenecer a la microflora del suelo que rodea las lagunas de oxidación (García, Comunicación personal).

Las características morfológicas de las colonias que crecieron son de color cremoso, con bordes irregulares y elevadas; al microscopio se observan bacilos Gram negativos y Gram positivos esporulados.

De las cepas que se lograron aislar sobresale una con la característica especial de producir un pigmento verde amarillento difusible en el medio, característica particular del género *Pseudomonas*.

Este pigmento es muy importante, ya que le confiere a la bacteria la propiedad de permanecer por largo tiempo en el campo (Zinsser 1994) y esto ayuda a cumplir con los objetivos deseados; además, este pigmento, según Neilands (1984), sirve como agente transportador de hierro, actúa como fitotoxina u hormona de crecimiento para las plantas según lo reportado por Gross y Cody (1985); así como también tiene la propiedad de actuar como agente antibiótico.

A partir del último tanque de recuperación de aceite (trampa de grasas) no se logró aislar ningún tipo de microorganismo debido a sus características de elevada temperatura, y posiblemente por no encontrarse en contacto con la microflora del suelo.

## Siembra en agar tributirina

De las 55 cepas sembradas en agar Tributirina se escogieron 6, las cuales presentaron un halo de lipólisis de diámetro mayor a 2,5 cm (Novo 1982). El crecimiento de los microorganismos en agar Tributirina se evidencia por la formación de un halo claro de contraste con el resto del medio de cultivo.

La siembra en este medio fue el criterio para seleccionar las cepas que harían parte del inóculo, ya que es un medio específico para la demostración y numeración de microorganismos lipolíticos en alimentos y otros materiales (Anderson 1939); así como para la demostración de lipasas en diversas especies de bacterias como por

ejemplo, *Staphylococcus* sp. (Innes, 1956), *Clostridios* (Willis, 1960), *Pseudomonas* sp., flavobacterias marinas (Hayes 1963) y otros.

Como sustancia reaccionante, este medio de cultivo contiene tributirina, a partir de cuya degradación por acción de lipasas extracelulares se producen halos de aclaramiento alrededor de las colonias de microorganismos lipolíticos, en contraste con el resto del medio de cultivo que permanece turbio (Merck 1994).

## Pruebas de antagonismo

A partir de las pruebas realizadas no se encontró antagonismo entre las seis cepas evaluadas, por lo que todas se usaron para conformar un inóculo mixto sin contrarrestar su actividad y crecimiento

## Curva de crecimiento

Esto se realizó con el fin de conocer el momento en el cual los microorganismos alcanzaban su fase máxima de multiplicación (Meyer et al. 1985) y así poder aplicarlos a un reactor, inoculando cada vez que se cumple el tiempo de la fase logarítmica equivalente al tiempo de retención en las lagunas de oxidación.

La cepa No. 2 alcanza rápidamente su fase logarítmica a las 24 horas, mientras la cepa No. 7 la alcanza entre las 48 y 72 horas. La cepa No. 3 alcanza su fase logarítmica a las 115 horas. Las cepas No. 1, 1A y 1B tienen un comportamiento, parecido puesto que alcanzan su fase máxima de multiplicación a las 96 horas (Fig. 1).

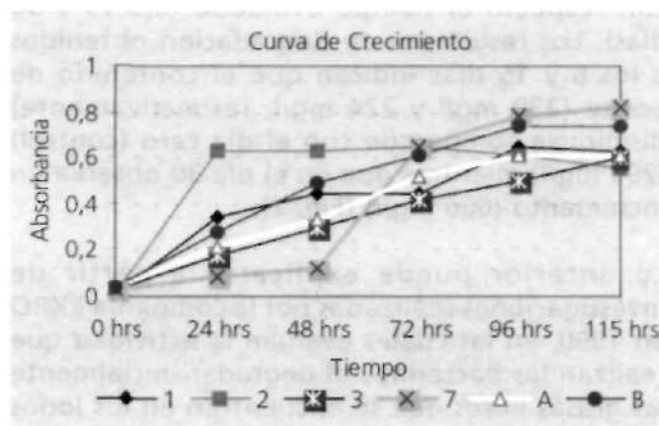


Figura 1. Curva de crecimiento de las seis cepas bacterianas aisladas.

Con estos datos, se decidió tomar 5 días, como el tiempo promedio en el que se podía alcanzar la fase logarítmica el inóculo mixto, y en ese momento realizar la segunda aplicación de microorganismos.

## Identificación de cepas

Las cepas identificadas por el Centro de Investigaciones Microbiológicas-CIMIC de la Universidad de los Andes fueron las codificadas con los números 1, 2, 3 y 7:

| Cepas | Género y especie                           |
|-------|--------------------------------------------|
| 1     | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 001          |
| 2     | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 002          |
| 3     | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 003          |
| 7     | <i>Enterobacter agglomerans</i> subgrupo 6 |

Las cepas codificadas con las letras A y B fueron identificadas en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Pontificia Universidad Javeriana:

| Cepas | Género y especie          |
|-------|---------------------------|
| A     | <i>Bacillus</i> sp.       |
| B     | <i>Staphylococcus</i> sp. |

## Evaluación de la actividad lipolítica a diferentes volúmenes

### Ensayo en reactor (5 litros)

En este ensayo se observaron diferencias significativas en los contenidos de aceite y grasas con respecto al tiempo evaluado (0,8,15 y 30 días). Los resultados de degradación obtenidos a los 8 y 15 días indican que el contenido de aceite (239 mg/l y 224 mg/l, respectivamente) disminuye comparado con el día cero (control) (295 mg/l) mientras que en el día 30 observa un incremento (666 mg/l) (Fig. 2).

Lo anterior puede explicarse a partir de investigaciones realizadas por la compañía EXRO en 1990, en las cuales evalúan la actividad que realizan las bacterias, al degradar inicialmente las grasas libres que se encuentran en los lodos livianos, y cuando estos componentes se agotan, los microorganismos toman la materia orgánica

que está unida a glóbulos de grasa presente en los lodos livianos, la degradan, los compuestos grasos son liberados y por lo tanto el contenido de grasas aumenta con el tiempo (Rodríguez 1996).

No se presentaron variaciones significativas de pH y temperatura durante los mismos días evaluados, aunque se observó que a medida que pasaba el tiempo el medio se alcalinizaba, indicando la actividad de las bacterias al utilizar el sustrato graso y degradarlo a ácidos grasos, liberando CO<sub>2</sub> y agua. El CO<sub>2</sub> alcaliniza el medio, por lo cual el pH aumenta (Barrera 1994).

Los datos de este ensayo se analizaron estadísticamente y mostraron que no hay diferencias entre las dos repeticiones ( $p=1,00$ ); a partir de este resultado se aplicó un análisis de varianza, en el cual se evidencia una diferencia significativa entre los días con una  $F=34,20$  y una  $p=0,0026$ ; finalmente se realizó una prueba a posteriori de Tukey, la cual permite agrupar los resultados en dos grupos homogéneos con una  $p=0,007$ : Grupo A (0, 8, y 15 días), los cuales muestran una disminución gradual de aceite; y el grupo B (30 días), en el cual se observa un aumento del contenido de aceite (Fig. 3).

### Ensayo de 60 litros en campo

A partir de los resultados obtenidos en el reactor de 5 litros, en el cual se presentó una disminución de aceite a los 15 días, se escogieron tiempos de 15 y 30 días para evaluar la degradación de aceite en los posteriores ensayos.

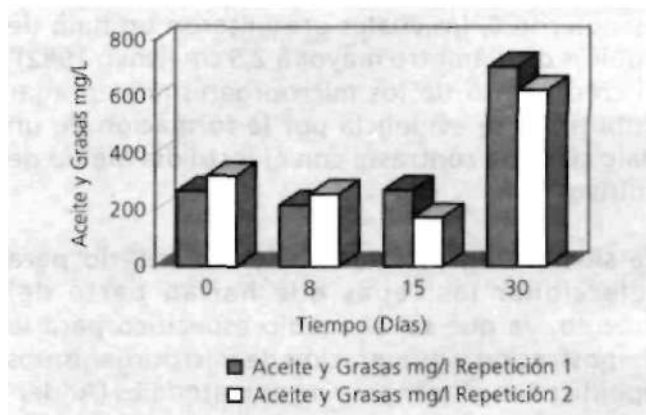


Figura 2 Degradación del contenido de aceite a los 0, 8, 15 y 30 días en reactor de 5 litros.

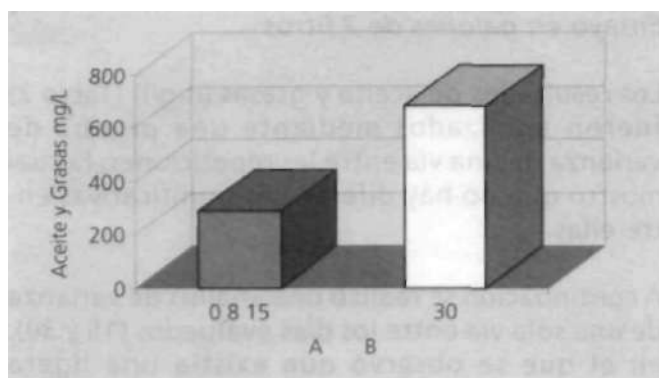


Figura 3 Comparación del contenido de aceite y grasas entre grupos de días en ensayo con reactor de 5 litros.

A B

Figura 3 Comparación del contenido de aceite y grasas entre grupos de días en ensayo con reactor de 5 litros.

Los resultados obtenidos, incluidos los cuatro que contienen inóculo bacteriano no generaron diferencias significativas entre tratamientos (Anava Kruskal-Wallis:  $F=0,27$  y  $p=0,84$ ), esto quiere decir que se puede aplicar cualquier tratamiento que contenga el inóculo bacteriano. Cabe anotar que al no ser necesario el empleo de sustancias, como los tensoactivos, los costos en el tratamiento de efluentes en las plantas extractoras no se incrementan. El contenido de aceite y grasas en mg/l en los ocho tratamientos evaluados se observa en la Tabla 1.

De igual forma se aplicó para determinar diferencias entre los días ( $F=48,86$  y  $p=0,000$ ) y se realizó una prueba a posteriori de Tukey con un nivel de significancia del 0,05, con la que se formaron dos grupos homogéneos: Grupo A: Datos a los 15 días; Grupo B: Datos a los 30 días; debido a una disminución gradual de aceite a los 15 días y un aumento considerable a los 30 días (Fig. 4).

Partiendo de los resultados anteriores se decidió analizar T1 y T2 (Fig. 5), debido a que T1 es el control y T2 es el tratamiento económicamente rentable compuesto únicamente por el inóculo bacteriano. Se analizaron las dos repeticiones a

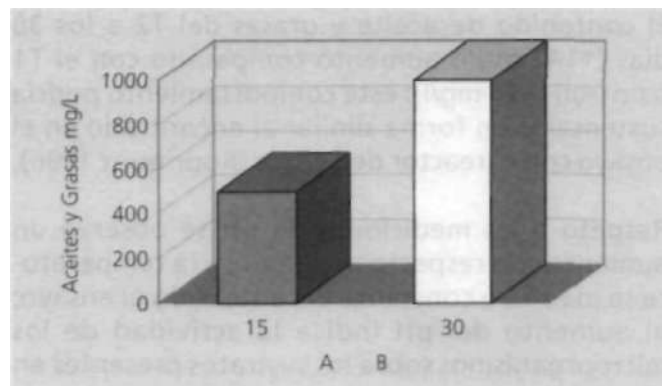


Figura 4 Comparación del contenido de aceite y grasas entre los 15 y 30 días en ensayo canecas de 60 litros.

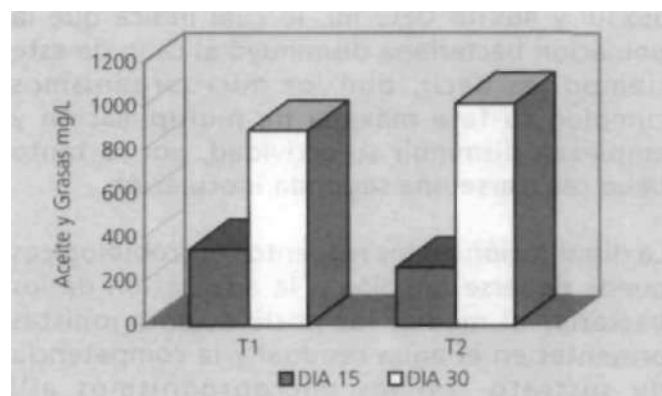


Figura 5. Comparación del contenido de aceite y grasas entre T1 y T2 a los 15 días en ensayo con canecas de 60 litros.

los 15 días con una prueba de Chi Cuadrado, la cual mostró que existen diferencias entre T1 (control) y T2 (agua residual + inóculo bacteriano), con una heterogeneidad o independencia de 12,33,  $p=0,0004$  y Grados de libertad=1.y76tt.

#### Datos promedio de las dos repeticiones

El T 2 sólo contiene el inóculo bacteriano, y esto indica la capacidad para degradar sustratos grasos por parte de los microorganismos sin que sea

necesaria la presencia de nutrientes y tensoactivo. Estudios similares realizados en un Proyecto de Efluentes en Cenipalma (1994) sustentan este comportamiento de los microorganismos.

Tabla. 1. Contenido de aceite y grasas en los ocho tratamientos evaluados en ensayo con canecas de 60 litros.

| Tiempo  | Ensayo galones 2 litros aceites y grasas mg/l |       |       |       |       |       |       |       |
|---------|-----------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|         | T1                                            | T2    | T3    | T4    | T5    | T6    | T7    | T8    |
| Inicial | 1.176                                         | 1.176 | 1.176 | 1.176 | 1.176 | 1.176 | 1.176 | 1.176 |
| 15      | 413                                           | 395   | 442   | 398   | 422   | 314   | 386   | 534   |
| 30      | 816                                           | 1.142 | 1.044 | 1.048 | 1.316 | 1.002 | 996   | 852   |

El contenido de aceite y grasas del T2 a los 30 días (1142 mg/l) aumentó comparado con el T1 (control) (816 mg/l); este comportamiento podría sustentarse en forma similar al encontrado en el ensayo con el reactor de 5 litros (Rodríguez 1996).

Respeto a las mediciones de pH se observó un aumento con respecto al tiempo; y la temperatura se mantuvo constante durante todo el ensayo; el aumento del pH indica la actividad de los microorganismos sobre los sustratos presentes en el medio .

Los recuentos microbiológicos después de ocho días de la primera inoculación oscilaron entre  $35 \times 10^7$  y  $46 \times 10^8$  UFC/ ml, lo cual indica que la población bacteriana disminuyó al cabo de este tiempo, es decir, que los microorganismos cumplen su fase máxima de multiplicación y empiezan disminuir su actividad, por lo tanto debe realizarse una segunda inoculación.

La disminución en los recuentos microbiológicos puede deberse también a la adaptación de los bacterias al medio, los posibles antagonistas presentes en el agua residual y la competencia de sustrato con los microorganismos allí existentes (Zinsser 1994).

Es importante mencionar el uso de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter agglomerans* que en condiciones aeróbicas degradan sustratos tan complejos como petróleo con buenos porcentajes de remoción (ICP 1996).

Bajo condiciones de campo lo ideal es que el porcentaje de remoción sea del 90%. El uso de bacterias comerciales permite una remoción de más del 50% del contenido de grasas y aceite en estos desechos, según investigaciones hechas por EPSA en 1991, y por esto se espera que las bacterias utilizadas en el inóculo realicen una remoción igual o mayor.

Tabla 2. Contenido de aceite y grasas en los ocho tratamientos evaluados en ensayo en galones de 2 litros.

| Tiempo  | Ensayo galones 2 litros aceites y grasas mg/l |       |       |       |     |     |     |       |
|---------|-----------------------------------------------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|-------|
|         | T1                                            | T2    | T3    | T4    | T5  | T6  | T7  | T8    |
| Inicial | 700                                           | 700   | 700   | 700   | 700 | 700 | 700 | 700   |
| 15      | 669                                           | 1.028 | 981   | 592   | 366 | 698 | 348 | 288   |
| 30      | 187                                           | 2.256 | 2.040 | 1.929 | 352 | 345 | 449 | 2.190 |

### Ensayo en galones de 2 litros

Los resultados de aceite y grasas (mg/l) (Tabla 2) fueron analizados mediante una prueba de varianza de una vía entre las repeticiones, la cual mostró que no hay diferencias significativas entre ellas.

A continuación se realizó una análisis de varianza de una sola vía entre los días evaluados (15 y 30), en el que se observó que existía una ligera diferencia, ( $F = 1, 29$  y  $p = 0,29$ ). Con base en este resultado se aplicó una prueba a posteriori de LSD, la cual permitió conformar dos grupos homogéneos: Grupo A: R2 (30), R3 (30), R1 (15), R2(15), R3 (15); y el Grupo B: R1 (30), R2 (30), R3 (30), con un nivel de significancia del 0,1 (Fig. 6).

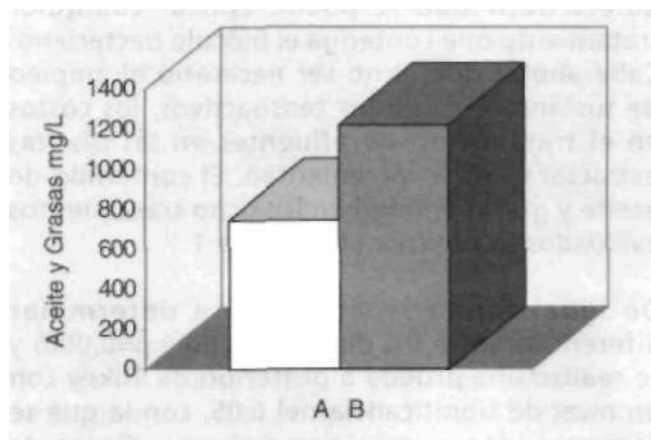


Figura. 6 Comparación del contenido de aceite y grasas entre grupos de días y tratamientos en ensayo con galones de 2 litros.

Los resultados anteriores indican que a los 30 días hay un aumento considerable del aceite comparado con los datos registrados a los 15 días, tiempo durante el cual disminuyó con respecto al T 1 (control).

Posteriormente se aplicó una prueba de Friedman (de dos vías) en la que no se observan diferencias entre las repeticiones ( $p = 0,77$ ); entre los tratamientos si se observan diferencias ( $p = 0,05$ ). Luego se realizaron dos

análisis de varianza comparando los diferentes tratamientos a los 15 y 30 días observando diferencias sólo en el primer caso.

Para demostrar las diferencias de los tratamientos a los 15 días se realizó una prueba a posteriori de LSD (alfa=0,03), observando la formación de tres grupos: Grupo A: T2 y T3, Grupo B: T1, T6 y T4, Grupo C: T5, T7 y T8. Como se observa en la Fig. 7.

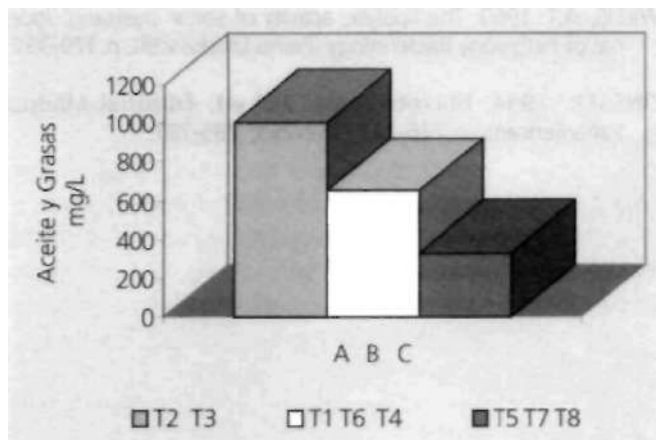


Figura 7 Comparación del contenido de aceite y grasas entre los ocho tratamientos del ensayo con galones de 2 litros.

El pH presentó un aumento con respecto al tiempo, y la temperatura se mantuvo constante durante todo el ensayo.

Los recuentos microbiológicos realizados a los ocho tratamientos después de la primera inoculación oscilaron entre  $47 \times 10^6$  y  $67 \times 10^8$  UFC7 ml, indicando que una vez se cumple la fase máxima de multiplicación y empiezan a disminuir su actividad, debe realizarse una segunda inoculación.

En resumen, es posible decir que los ensayos llevados a cabo en laboratorio sólo se utilizan para el aislamiento y recuperación de microorganismos lipolíticos, ya que las condiciones de campo difieren notoriamente de las condiciones controladas. Por el contrario, trabajando sobre las piscinas de 60 litros es posible encontrar diferencias entre T1 (control) y T2 (agua residual + inóculo bacterial).

## CONCLUSIONES

Se obtuvo un porcentaje máximo de remoción de aceite del 40% a los 15 días, en el ensayo con canecas de 60 litros (condiciones experimentales de campo).

Las bacterias aisladas *Pseudomonas aeruginosa* 001, *Pseudomonas aeruginosa* 002, *Pseudomonas aeruginosa* 003, *Enterobacter agglomerans* subgrupo 6, *Staphylococcus* spp. y *Bacillus* spp., bajo condiciones aeróbicas controladas de laboratorio presentan baja capacidad degradadora de grasa y aceites.

Las bacterias aisladas no presentan características antagónicas y pueden ser utilizadas en un inóculo lipolítico mixto.

La aplicación de solución de nutrientes y tensoactivo no afectan la actividad de las bacterias.

El pH del sustrato al aplicar las bacterias lipolíticas presenta un incremento exponencial como consecuencia de la acción de las bacterias lipolíticas.

La evaluación de grasas y aceites realizadas a los 15 y 30 días puede corresponder a una etapa intermedia de catabolismo de los ácidos grasos, lo cual no correspondería a una medición real de la capacidad degradadora de las bacterias aisladas ya que la bioquímica de la reacción podría utilizar mayor tiempo.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, J.A. 1939. The use of tributyrin agar in dairy bacteriology. International Microbiology Congress. No. 3. p.726-728.
- BARRERA, S. 1994. Introducción a la problemática del medio ambiente. Departamento de Ingeniería Civil. Universidad de los Andes. Santafé de Bogotá. p.219-225.
- CENIPALMA. 1994. Proyecto Manejo de Efluentes. Estudio Microbiológico. Ceniavances. Octubre.
- DUPHJOHANN, J. 1994. Un nuevo proceso para recuperar el aceite de palma. Palmas (Colombia) v.15 no.2, p.69-72.
- GARCÍA, J.A.; RUBIANO M., G.; BAYONA S., G.F.; PELAEZ D., C.M.; LASSO, C; ORTIZ B., S.P. 1995. Manejo ambiental de

- efluentes y emisiones de plantas extractoras. Palmas (Colombia) v. 16 no. especial, p. 163 - 176.
- GARCÍA, J.A. 1996. Comunicación personal. Cenipalma, Bogotá, D.C.
- GAUZE, G.F. 1965. Conferencias de antibióticos. Antibióticos elaborados por hongos. Editora Universitaria, La Habana. Cuba.
- GOVAN, J.R. 1978. Pyocin Typing of *Pseudomonas aeruginosa*. Methods in Microbiology. Vol 10.
- HAYES, P.R. 1963. Studies on marine flavobacteria. Journal of General Microbiology (Reino Unido) v.30, p.1-19.
- ICP. 1996. Proyectos de recuperación, Instituto Colombiano de Petróleo. Piedecuesta, Santander.
- INNES, A.G. 1956. Coagulase positive *Staphylococci* from bulk milk supplies low in solids-notfat. Journal of Applied Bacteriology (Reino Unido) v.19, p.39-45.
- MERCK. 1994. Manual de Medios de Cultivo. 178p.
- MEYER, H.P; KAPPELI, O.; FRECHTER, A. 1985. Growth control in microbial cultures. Annual Review Microbiology. 3ª Edición. p,299.
- NEILANDS, J.B. 1984. Methodology of siderophores. Applied Review of Phytopathology (Estados Unidos) v.25, p.5820-5824.
- NOVO, R. 1987. Microbiología. Ejercicios Prácticos. Facultad Agronomía y Sanidad Vegetal. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de la Habana, La Habana, Cuba.
- WILLIS, A.T. 1960. The lipolytic activity of some clostridio. Journal of Pathology Bacteriology (Reino Unido) v.80, p.379-390.
- ZINSSER. 1994. Microbiología. 20ª ed. Editorial Médica Panamericana. p,736-743; 752-753; 785-787.