



**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE REMOCIÓN EN DEMANDA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA DE OXÍGENO, Y SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES DE EFLUENTES INDUSTRIALES CON BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS Y EXOPOLISACÁRIDOS A ESCALA DE LABORATORIO EN EMPRESAS DEL SECTOR DE ALIMENTOS DE LA CIUDAD DE MANIZALES**

**Frank Alberto Cuesta González**

Universidad de Manizales  
Facultad de Ciencias Contables Económicas y Administrativas  
Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente  
Manizales, Colombia

2014



**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE REMOCIÓN EN DEMANDA QUÍMICA Y  
BIOQUÍMICA DE OXÍGENO, Y SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES DE EFLUENTES  
INDUSTRIALES CON BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS  
Y EXOPOLISACÁRIDOS A ESCALA DE LABORATORIO EN EMPRESAS DEL  
SECTOR DE ALIMENTOS DE LA CIUDAD DE MANIZALES**

**Frank Alberto Cuesta González**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente**

Director (a):

MSc Ingeniería Química: Annie Alexandra Cerón Sánchez

Codirector:

MSc (c) en Microbiología Agroindustrial: Guido Ernesto Villota Calvachi

Línea de Investigación:

Biosistemas integrados

Grupo de Investigación:

<sup>1</sup>Grupo de investigación en bioprospección, biotecnología y recursos naturales (BIOREN)

Universidad de Manizales

Facultad de Ciencias Contables Económicas y Administrativas

Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente

Manizales, Colombia

2014



*A mi familia:*

*Quienes siempre han confiado en mí y en los  
proyectos de vida que he llevado a cabo  
durante mi vida.*

## **Agradecimientos**

A Dios quien con su mano me llevó por el camino y no me dejó desfallecer en la búsqueda de conocimiento y apoyo.

A mi esposa Claudia Liliana Tangarife M. en quien siempre encontré una voz de aliento y me apoyó en los momentos difíciles.

A mis hijos Andrea y Sergio que entregaron el tiempo que les pertenecía para el desarrollo de este trabajo.

Al doctor Julián Muñoz Subdirector del Centro para la Formación Cafetera del SENA Regional Caldas, quien me brindó su apoyo en los tiempos dedicados a la investigación.

A Dyro Alexander Bustamante coordinador académico del Centro para la Formación Cafetera del SENA Regional Caldas, quien me permitió utilizar el laboratorio de ciencias básicas del SENA Regional Caldas.

A mi amigo y codirector Guido Ernesto Villota Calvachi quien me abrió las puertas para hacer parte de su equipo de investigación y me ofreció todos sus conocimientos, su tiempo y la disponibilidad total del laboratorio de biotecnología del SENA Regional Caldas.

Al director de la línea de investigación de Biosistemas integrados de la universidad de Manizales Jhon Fredy Betancur, por creer en el desarrollo de esta investigación.

A mi asesora Annie Alexandra Cerón Sánchez quien me brindó el apoyo técnico para el desarrollo de este proyecto.

A Lizeth Carolina Rosero Zambrano, por su gran gestión en la adquisición de recursos necesarios para el desarrollo del macroproyecto.

A Yaneth Morales y Carlos Humberto Kogson quienes facilitaron el ingreso a las empresas que participaron en esta investigación.

A Viviana Lorena Bohórquez Zapata bióloga de la Universidad de Caldas y aprendiz de la Tecnología en Agua y Saneamiento, quien con su apoyo hizo posible la realización de muestreos, seguimiento a reactores y análisis de laboratorio.

A mis aprendices de la Tecnología en Agua y Saneamiento José Rogelio Ramírez, Helier Castillo y Eduard Ferney Castillo quienes me prestaron apoyo en la preparación y seguimiento de los reactores.

A mis aprendices de la Tecnología en Análisis Químico Mariela Vargas y Manuel Fernando Henao, quienes apoyaron en el alistamiento de los puntos de muestreo los ensayos piloto.

A Diana Marcela Flores quien me prestó su apoyo en el laboratorio de ciencias básicas del SENA Regional Caldas.

## Resumen

Los efluentes industriales son fuente de contaminación en los cuerpos de agua; pueden ser tratados con microorganismos especializados que transforman este sustrato en subproductos de uso industrial, y a su vez disminuyen la carga contaminante. Las bacterias pueden producir diferentes compuestos, entre ellos los polihidroxicarboxilatos (PHA) y Exopolisacáridos (EPS), aprovechando esta propiedad se evaluaron los niveles de remoción en demanda química y bioquímica de oxígeno, y sólidos suspendidos totales de efluentes industriales de dos empresas del sector alimenticio de la ciudad de Manizales, mediante la utilización de reactores aerobios tipo batch, inoculados con bacterias que presentaron mayor producción de EPS y PHA en medio sintético, a las cuales se les realizó cinética de crecimiento, registrando la variación de pH, con el fin de tener un punto de referencia en el sustrato objeto de estudio. Se obtuvo remociones hasta del 99,07% en S.S.T., 99,17% en DBO<sub>5</sub> y 85,93% en DQO, alcanzando producciones de 1667 mg/L de PHA y de 6483 mg/L de EPS.

**Palabras clave:** biopolímeros, biorreactor, consorcio, exopolisacáridos, polihidroxicarboxilatos, reactor batch, sustrato.

## Abstract

Industrial effluents are a source of pollution in bodies of water can be treated with specialized microorganisms that transform this substrate in products for industrial use, and in turn reduce the pollutant load. Bacteria can produce different compounds, including

polyhydroxyalkanoates (PHA ) and Exopolysaccharide (EPS ) , taking advantage of this property removal levels were evaluated in chemical and biochemical oxygen demand and total suspended solids from industrial effluents of two food businesses city of Manizales, using aerobic batch reactors , inoculated with bacteria showed higher production of EPS and PHA synthetic medium, which underwent growth kinetics, recording the variation in pH, in order to have a reference point on the substrate under study. Removals of up to 99.07 % in SST , 99.17 % and 85.93 % in BOD5 in COD was obtained , reaching yields of 1667 mg / L of PHA and 6483 mg / L of EPS

**Keywords:** boipolimers, biorreactor, consortium, exopolysaccharides, polyhydroxialkanoates, batch reactor, substratum.

# Contenido

Resumen.....	VIII
Indice de figuras .....	XII
Indice de tablas .....	XV
Indice de Anexos .....	XVII
Lista de Símbolos y abreviaturas .....	XVIII
Introducción .....	1
<b>1. Problematización .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Justificación.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>8</b>
3.1 Objetivo general.....	8
3.2 Objetivos específicos .....	8
<b>4. Marco teórico .....</b>	<b>9</b>
<b>4.1 Aguas residuales .....</b>	<b>9</b>
4.1.1 Generalidades.....	9
4.1.2 Aguas residuales domésticas.....	10
4.1.3 Aguas residuales industriales.....	10
4.2 Plantas de tratamiento de aguas residuales.....	11
4.2.1 Sistemas de tratamiento de aguas residuales .....	12
4.3 Microorganismos.....	16
4.3.1 Características microscópicas .....	17
4.3.2 Características macroscópicas .....	17
4.3.3 Pruebas bioquímicas.....	18
4.4 Biopolímeros.....	18
4.4.1 Polihidroxicarboxilatos.....	18
4.4.2 Exopolisacáridos .....	21
4.4.3 Biosíntesis de polímeros bacteriales .....	24
<b>5. Antecedentes .....</b>	<b>26</b>
<b>6. Estrategia metodológica .....</b>	<b>28</b>

6.1	Selección de los aislados que presenten mayor producción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos en medio sintético .....	28
6.1.1	Extracción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos en medio sintético....	28
6.1.2	Determinación de las diferencias bioquímicas de los aislados seleccionados	29
6.1.3	Cinética de crecimiento de los aislados seleccionados .....	29
6.2	Ensayo piloto en biorreactores tipo batch.....	30
6.3	Evaluación de la remoción en niveles de S.S.T, DQO y DBO <sub>5</sub> , a escala de laboratorio.....	30
6.3.1	Caracterización fisicoquímica de los afluentes de las empresas objeto de investigación .....	30
6.3.2	Montaje de reactores batch .....	31
6.4	Determinación de la relación entre los niveles de remoción de los aislados seleccionados y la producción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos .....	31
<b>7.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>32</b>
7.1	Selección de los aislados que presentan mayor producción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos en medio sintético .....	32
7.1.1	Extracción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos en medio sintético....	32
7.2	Estudio de cinética de crecimiento en medio sintético.....	37
7.2.1	Aislados seleccionados en la empresa de alimentos del sector de los lácteos y el maíz .....	37
7.2.2	Estudio de cinética de crecimiento de los aislados seleccionados para las empresas de alimentos del sector de la confitería .....	38
7.3	Prueba piloto .....	41
7.3.1	Comportamiento del pH con la inoculación de las bacterias SP3 y SE1 en vertimientos de una empresa de alimentos del sector de la confitería .....	41
7.4	Evaluación de la remoción en niveles de Sólidos Suspendidos totales (S.S.T), Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Demanda Bioquímica de Oxígeno en cinco días (DBO <sub>5</sub> ), a escala de laboratorio .....	46
7.4.1	Caracterización fisicoquímica .....	48
7.4.2	Remoción de sólidos suspendidos totales .....	49
7.4.3	Remoción de demanda bioquímica de oxígeno .....	51
7.4.4	Remoción de demanda química de oxígeno .....	53
7.4.5	Comparativo entre remociones con respecto a los aislados seleccionados ...	55
7.5	Determinación de la relación entre los niveles de remoción de los aislados seleccionados y la producción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos .....	56
7.5.1	Producción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos.....	57
7.5.2	Porcentaje de remoción con respecto a la producción de PHA y EPS. ....	59
<b>8.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>64</b>
8.1	Conclusiones.....	64
8.2	Recomendaciones.....	65
<b>9.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>66</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>73</b>

## Indice de figuras

Figura 1. Sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales_____	11
Figura 2. Proceso de tratamiento anaerobio_____	14
Figura 3. Proceso de tratamiento aerobio _____	15
Figura 4. Formula estructural de los PHA _____	19
Figura 5. Principales rutas metabólicas hacia la síntesis de varios polímeros _____	24
Figura 6. Producción de PHA en miligramos / litro a las 24, 48 y 72 horas de 8 aislados provenientes de una empresa de alimentos lácteos y del maíz. _____	32
Figura 7. Producción de PHA en gramos / litro a las 24, 48 y 72 horas de 8 aislados provenientes de una empresa de alimentos del sector de la confitería_____	33
Figura 8. Producción de EPS en miligramos / litro a las 72 horas de 10 aislados provenientes de una empresa de alimentos lácteos y del maíz. _____	34
Figura 9. Producción de EPS en gramos / litro a las 72 horas de 10 aislados provenientes de una empresa de alimentos lácteos y del maíz. _____	34
Figura 10. Cinética de crecimiento y análisis de pH de los aislados NE3 y NE9 nativos de una empresa de lácteos y del maíz. _____	37
Figura 11. Cinética de crecimiento y análisis de pH de los aislados PHA 124 y 131 nativos inoculados en vertimientos industriales de una empresa de alimentos de los lácteos y del maíz. _____	37
Figura 12. Cinética de crecimiento y análisis de con una mezcla de EPS 124, 131 y PHA 124 y 131 inoculadas en vertimientos industriales de una empresa de alimentos de los lácteos y del maíz. _____	38

---

Figura 13. Cinética de crecimiento y análisis de pH con los aislados EPS 86 y 97 inoculados en vertimientos industriales de una empresa de alimentos del sector de la confitería. _____	38
Figura 14. Cinética de crecimiento y análisis de pH con los aislados PHA 101 y 104b inoculados en vertimientos industriales de una empresa de alimentos del sector de la confitería. _____	39
Figura 15. Cinética de crecimiento y análisis de pH con una mezcla de EPS 124, 131 y PHA 124 y 131 inoculados en vertimientos industriales de una empresa de alimentos de los lácteos y del maíz. _____	39
Figura 16. Comportamiento del pH en vertimiento de empresa de alimentos del sector de la confitería autoclavado e inoculado con aislado SP3 productor de PHA y SE1 productor de EPS. _____	41
Figura 17. Comportamiento de la sedimentación en vertimiento de empresa de alimentos del sector de la confitería autoclavado e inoculado con aislado SP3 productor de PHA y SE1 productor de EPS. _____	42
Figura 18. Comportamiento de la turbidez después de sedimentación en vertimiento de empresa de alimentos del sector de la confitería autoclavado e inoculado con aislado SP3 productor de PHA y SE1 productor de EPS. _____	43
Figura 19. Comportamiento de la conductividad en vertimiento de empresa de alimentos del sector de la confitería autoclavado e inoculado con aislado SP3 productor de PHA y SE1 productor de EPS. _____	44
Figura 20. Comportamiento del oxígeno disuelto después de sedimentación en vertimiento de empresa de alimentos del sector de la confitería autoclavado e inoculado con aislado SP3 productor de PHA. _____	45
Figura 21. Comportamiento del pH en afluente de una empresa de alimentos lácteos y del maíz al inocular el aislado NP2. _____	46
Figura 22. Comportamiento del pH en afluente de una empresa de alimentos del sector de la confitería al inocular el aislado SP4 _____	47
Figura 23. Porcentaje de remoción con respecto a los aislados seleccionados de la empresa de alimentos del sector lácteo y del maíz _____	55
Figura 24. Porcentaje de remoción con respecto a los aislados seleccionados en una empresa de alimentos del sector de la confitería _____	55
Figura 25. Porcentaje de remoción con respecto a la producción de PHA en una empresa de alimentos lácteos y del maíz. _____	59

Figura 26. Porcentaje de remoción con respecto a la producción de PHA en una empresa de alimentos del sector de la confitería \_\_\_\_\_ 60

Figura 27. Porcentaje de remoción con respecto a la producción de EPS en una empresa de alimentos lácteos y del maíz \_\_\_\_\_ 61

Figura 28. Porcentaje de remoción con respecto a la producción de EPS en una empresa de alimentos del sector de la confitería \_\_\_\_\_ 62

## Índice de tablas

Tabla 1. Pruebas bioquímicas de los aislados productores de PHA escogidos para una empresa de alimentos lácteos y del maíz _____	35
Tabla 2. Pruebas bioquímicas de los aislados productores de EPS escogidos para una empresa de alimentos lácteos y del maíz _____	36
Tabla 3. Pruebas bioquímicas de los aislados productores de PHA escogidos para una empresa de alimentos del sector de la confitería _____	36
Tabla 4. Pruebas bioquímicas de los aislados productores de EPS escogidos para una empresa de alimentos del sector de la confitería _____	36
Tabla 5. Caracterización fisicoquímica de los vertimientos antes de ser tratados, de una empresa de alimentos lácteos y del maíz _____	48
Tabla 6. Caracterización fisicoquímica de los vertimientos antes de ser tratados, de una empresa de alimentos del sector de la confitería. _____	48
Tabla 7. Remoción de S.S.T en empresa de alimentos lácteos y del maíz _____	49
Tabla 8. Porcentaje de remoción de S.S.T. de una empresa de alimentos del sector de la confitería. _____	50
Tabla 9. Remoción de DBO <sub>5</sub> en empresa de alimentos lácteos y del maíz _____	51
Tabla 10. Porcentaje de remoción de DBO <sub>5</sub> de una empresa de alimentos del sector de la confitería _____	52
Tabla 11. Porcentaje De remoción de DQO en empresa de alimentos lácteos y del maíz _____	53
Tabla 12. Porcentaje De remoción de DQO de una empresa de alimentos del sector de la confitería _____	54
Tabla 13. Producción de PHA en afluentes de una empresa de alimentos del sector lácteo y del maíz _____	57

Tabla 14. Producción de PHA en una empresa de alimentos del sector de la confitería 57

Tabla 15. Producción de EPS en los afluentes de una empresa de productos lácteos y del maíz \_\_\_\_\_ 58

Tabla 16. Producción de EPS de una empresa de alimentos del sector de la confitería 58

## Índice de Anexos

Anexo A. Extracción de PHA _____	66
Anexo B. Extracción de EPS _____	67
Anexo C. Montaje prueba piloto _____	68
Anexo D. Esquema montaje biorreactores _____	69
Anexo E. Características de los aislados de la empresa de alimentos del sector de los lácteos y del maíz. _____	70
Anexo F. Características de los aislados de la empresa de alimentos del sector de la confitería. _____	71
Anexo G. Biopolímeros sintetizados por el aislado SE4 _____	72

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
A	Acido
Ba <sup>2+</sup>	Ion Bario
°C	Temperatura en Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Ion Calcio
CAF	Corporación andina de Fomento
CH <sub>4</sub>	Metano
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COT	Carbono orgánico total
DBO <sub>5</sub>	Demanda bioquímica de oxígeno en 5 días
DQO	Demanda química de oxígeno
EPS	Exopolisacáridos
H <sub>2</sub>	Hidrogeno
HA	Ácidos hidroxialcanoicos
K	Alcalino
LIA	Agar hierro lisina
mg/L	Miligramo por cada litro
Nm	Nanómetros
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ion nitrato
OD	Densidad óptica

pH	potenciales de Hidrogeno
PHA	Polihidroxialcanoatos
PHB	Poli-L-hidroxibutirato: polyester termoplástico
Sr+2	Ion Estroncio
SIM	Sulfuros Indol Motilidad
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	Ion sulfato
SST	Sólidos suspendidos totales
TSI	Agar triple azúcar hierro
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	Ion Fosfato



## Introducción

La actividad productiva es uno de los pilares fundamentales del desarrollo económico. Sin embargo, los residuos generados y el excesivo consumo de recursos naturales, pueden constituirse en agentes de deterioro del medio ambiente, restando sustentabilidad al crecimiento económico. Como consecuencia de ello, la dimensión ambiental ha adquirido mayor importancia en el diseño de procesos, en la toma de decisiones de inversión y en la gestión productiva. (Zaror, 2000).

Bajo este contexto las aguas residuales generadas por los procesos industriales pueden proveer materiales de desecho que pueden ser aprovechadas por microorganismos, “desde el punto de vista del metabolismo microbiano, estas aguas residuales pueden considerarse como un “medio de cultivo” que permite el crecimiento de determinadas poblaciones microbianas, las cuales, interactúan entre si y llevan a cabo una gran cantidad de reacciones que conllevan a la degradación de materia orgánica y la remoción de nutrientes; estos procesos de bioconversión, pueden ser de gran impacto e interés a escala industrial, ya que es posible desarrollar sistemas de tratamiento económicos, eficientes, sin subproductos contaminantes y además permiten la recuperación de metabolitos con amplias aplicaciones industriales, tales como los PHAs. (Bitton, 2005; Bravo et al., 2005).

“Los Polihidroxialcanoatos (PHA) son un grupo de poliésteres de origen natural, biodegradables y biocompatibles sintetizados intracelularmente como una reserva de energía de carbono por una amplia gama de bacterias (Neira & Pardo, 2010), estos “microorganismos que los acumulan pertenecen a dos grupos: aquellos que los acumulan por limitación de un nutriente en presencia de una fuente de carbono en exceso, y aquellos que los acumulan durante su crecimiento”. (Rittmann & McCarty, 2001).

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son sintetizados por muchas especies de distintos géneros bacterianos en condiciones de crecimiento caracterizadas por exceso en la fuente carbonada y limitación de otros nutrientes como nitrógeno o fósforo. (De Almeida *et al.*, 2004).

Los microorganismos productores de exopolisacáridos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, incluyendo especies de vida libre saprobios como patógenos de animales y vegetales (Kang & Cottrell, 1979).

Generalmente, los exopolisacáridos están compuestos en su mayoría por carbohidratos, pudiendo presentar sustituyentes orgánicos e inorgánicos además de azúcares (Sutherland, 1988).

Las condiciones anteriormente mencionadas permiten seleccionar industrias como las de alimentos, de los sectores de los lácteos, del maíz y de confitería, como fuentes de carbohidratos en sus vertimientos, que será utilizada como materia prima por bacterias productoras de biopolímeros, teniendo como impacto ambiental positivo la remoción de sólidos suspendidos totales (SST), demanda química de oxígeno (DQO) y demanda bioquímica de oxígeno en 5 días (DBO<sub>5</sub>).

Para dar inicio a esta investigación fue necesario partir de aislados conservados de cada una de las empresas objeto de estudio, por investigadores de Tecnoparque SENA nodo Manizales y la Universidad Católica de Manizales.

Esta investigación planteó seleccionar los aislados de mayor producción de PHA y EPS en medio sintético, caracterizar fisicoquímicamente los afluentes de las empresas objeto de investigación, evaluar la remoción en niveles de SST, DQO, DBO<sub>5</sub>, a nivel de laboratorio utilizando aislados seleccionados y evaluar la producción de PHA y EPS.

Para el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo del SENA Regional Caldas con la disponibilidad de los laboratorios de Biotecnología de Tecnoparque nodo Manizales y el de Ciencias Básicas del Centro para la Formación Cafetera, la cual está enmarcada en el macroproyecto “Implementación de un sistema de tratamiento de efluentes industriales con bacterias productoras de biopolímeros” con el cual se adquirieron recursos limitados en equipos y reactivos, bajo esta limitante se diseñó una metodología que permitiera realizar

una investigación de tipo cuasi-experimental con enfoque cualitativo - cuantitativo, que permitió determinar valores de remoción de SST, DQO y DBO5, haciendo uso de bacterias nativas productoras de PHA y EPS de cada uno de los vertimientos a analizar.

# 1. Problematicación

La producción industrial aporta bienes, servicios y empleos a la economía, pero es también una fuente importante de contaminación y residuos constituidos por un conjunto de sustancias no deseadas que se generan en las actividades correspondientes de cada industria.

Incluidas las emisiones al aire o aguas de superficie y las sustancias descargadas en plantas de tratamiento, depositadas en rellenos sanitarios, emitidas o aplicadas en los suelos, tratadas, inyectadas en el subsuelo, controladas en sitios de almacenamiento, recicladas o quemadas para recuperación de energía (Agardy *et al.*, 2008).

Aparte de sus potenciales efectos en el medio ambiente, los residuos representan ineficiencias en la producción industrial. Los residuos entrañan costos para las plantas; éstas deben pagar por su manejo, el cumplimiento de las normas y la subutilización de las materias primas. Desde una perspectiva social los costos económicos incluyen el pago por el saneamiento de sitios contaminados, el pago de la tasa retributiva de las industrias generadoras de desechos y el aseguramiento de tratamiento para atender los efectos adversos producidos por la exposición ambiental. Los costos no monetarios incluyen el agotamiento de recursos no renovables, el uso consuntivo del suelo y la degradación de los ecosistemas. (Agardy *et al.*, 2008).

Los ríos, y en general las corrientes de agua pueden asimilar cierta cantidad de residuos antes de llegar a estar contaminados. En líneas generales, cuanto más caudalosos, rápidos y más aislados estén los cuerpos de agua más capaces son de tolerar una cantidad mayor de aguas residuales; pero una cantidad excesiva de cualquier tipo de contaminante conlleva

al deterioro de dicha capacidad de asimilación y en últimas a su contaminación (Bastidas & Ramírez, 2007).

Durante los últimos años la quebrada Manizales y la quebrada Olivares han recibido los vertimientos domésticos y del sector industrial que se han asentado alrededor de esta importante microcuenca, esta situación ha generado diferentes conflictos alrededor del recurso, agotando la capacidad de asimilación de los contaminantes vertidos sobre esta quebrada, con niveles de parámetros fisicoquímicos que impiden el uso del recurso para diferentes actividades.

Tanto los efluentes industriales como los cloacales deben ser tratados correctamente para que puedan ser vertidos al cuerpo receptor final y así de esta manera, proteger al medio ambiente y cumplir con las regulaciones vigentes. Sin embargo el elevado costo de la ingeniería y tratamiento, hace que debemos buscar alternativas viables que tiendan a disminuir éstos gastos. “La biorremediación constituye en la actualidad una herramienta excelente por medio de la cual se puede aprovechar la capacidad degradadora de los microorganismos para disminuir el contenido tóxico de un residuo o la carga orgánica de un líquido residual” (Belloso, 2000).

Por esta razón se consideró evaluar la eficiencia de un sistema de biodegradación que combina prácticas de manejo de hábitat y manejo de poblaciones microbianas como una alternativa ambientalmente sustentable para el tratamiento de efluentes industriales.

## 2. Justificación

El desarrollo industrial del país no puede darse sin que su actividad inherente genere unos efectos secundarios que resultan perjudiciales tanto para el ser humano como para el medio ambiente; razón por la cual se deben tomar medidas que mitiguen y disminuyan de manera considerable dichos efectos y restablecer el equilibrio. Según el observatorio para el desarrollo sostenible (Manizales – Colombia) de la Universidad Nacional de Colombia (BIOMANIZALES), la ciudad de Manizales se ha posicionado como un polo de desarrollo industrial y comercial del Departamento; contando con industrias de carácter internacional, nacional y local representando el 3,83% del área urbana.

Como producto de dicho desarrollo industrial junto con los asentamientos urbanos y la actividad agrícola, la calidad del agua de la quebrada Manizales y la quebrada Olivares comenzó a verse afectada; sobrepasando su capacidad de asimilación ante la gran cantidad de efluentes vertidos. En la actualidad la quebrada Manizales es el principal contaminante del río Chinchiná que después de utilizarse en riego, consumo y generación eléctrica desemboca al río Cauca, recogiendo la mayor parte de los efluentes industriales de la ciudad de Manizales (el 90% de la carga contaminante vertida proviene del sector industrial), de allí la importancia y necesidad de establecer mecanismos eficientes encaminados a la recuperación y sostenibilidad hacia el futuro de este recurso hídrico y a un adecuado tratamiento de dichos efluentes antes de ser vertidos. (Bastidas & Ramírez, 2007).

En tal sentido desde Tecnoparque del SENA Regional Caldas se introduce en nuestro contexto dicha tecnología a través de la propuesta en el tema biopolímeros para uso en biorremediación que es una tecnología que utiliza “el potencial metabólico de los microorganismos (fundamentalmente bacterias, Y EN ALGUNOS CASOS hongos y levaduras) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples poco o

nada contaminantes, y, por tanto, utilizados para limpiar terrenos o aguas contaminadas” (Glazer & Nikaido, 1995).

Bajo este argumento la presente propuesta articula los diferentes eslabones de las cadenas de productos de alto valor agregado como lo son: Centros de Investigación de Biotecnología y Microbiología de la Universidad Católica, Red de Emprendimiento del SENA Regional Caldas, Sector Industrial – Empresarial como aquellas productoras de alimentos del sector de la confitería, de los lácteos y del maíz, y demás a quienes les interesa generar desarrollo regional a través de la puesta en marcha de alternativas de usos de los recursos biológicos a bajos costos.

El uso de bacterias de importancia industrial y en el caso específico, productoras de biopolímeros, no solo contribuyen al conocimiento de las microbiota presente en los efluentes industriales de la región sino que permitirá el desarrollo de aislados bacterianos con gran potencial biotecnológico, para la producción de biopolímeros y de otras sustancias como enzimas, metabolitos entre otros, el desarrollo de procesos industriales, en miras al posicionamiento de la industria biotecnológica local.

La sostenibilidad del proyecto se respalda en el hecho de que las empresas continúan buscando un proceso de mejora continua en la gestión ambiental, esto se hace evidente en aquellas empresas que ya han implementado sistemas de tratamiento de aguas o buscan con optimizarlos con desarrollos de alternativas tecnológicas.

Las principales estrategias aplicables a los sectores productivos para un aprovechamiento eficiente de los recursos con la consecuente reducción de impactos ambientales, están basadas en brindar las herramientas de gestión y conocimiento para la formulación de proyectos de producción más limpia como estrategia empresarial preventiva, integrada y enfocada hacia la optimización de los procesos productivos. Los productos y los servicios, permiten reducir costos, incentivar innovaciones, mejorar la competitividad de las empresas, y reducir los riesgos al ser humano y al medio ambiente.

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo general**

Evaluar los niveles de remoción en demanda química y bioquímica de oxígeno, y sólidos suspendidos totales de efluentes industriales con bacterias productoras de polihidroxialcanoatos y exopolisacáridos a escala de laboratorio en empresas del sector de alimentos de la ciudad de Manizales.

### **3.2 Objetivos específicos**

Seleccionar los aislados que presenten mayor producción de polihidroxialcanoatos y exopolisacáridos en medio sintético.

Realizar ensayo piloto en reactores tipo batch.

Evaluar la remoción en niveles de DBO<sub>5</sub>, DQO y S.S.T con muestras tomadas en cada uno de los efluentes industriales mediante reactores aerobios tipo batch a escala de laboratorio utilizando los aislados seleccionados.

Determinar de la relación entre los niveles de remoción de los aislados seleccionados y la producción de polihidroxialcanoatos y exopolisacáridos.

## **4. Marco teórico**

### **4.1 Aguas residuales**

#### **4.1.1 Generalidades**

Las aguas residuales municipales son esencialmente aquellas aguas de abastecimiento que después de ser utilizadas en las actividades domésticas (consumo humano, cocimiento de alimentos, aseo personal y local, etc.) y productivas (lavados, diluciones, calentamientos, refrigeración, etc.) son descargadas a los alcantarillados domiciliarios o directamente al ambiente (Minambiente, 2002).

La microcuenca de la quebrada Manizales recibe, una gran cantidad de vertimientos entre los que se encuentran los domésticos de los sectores de Maltería, La Enea, La Florida, Los Cámbulos, Estambul entre otros, recibe los vertimientos industriales de un número importante de industrias presentes en la ciudad de Manizales, las cuales se encuentran ubicadas en el sector de Maltería.

Haciendo un recorrido por el cauce de la quebrada se puede observar el gran deterioro que sufre a lo largo de su recorrido donde recibe vertimientos industriales de empresas como Progel S.A. Colombit, Industria Licorera de Caldas, Súper de Alimentos, Normandy, Top Tec, Herragro y todas aquellas ubicadas en la zona industrial Juanchito.

Debido a la variedad de aguas residuales que recibe LA quebrada, se puede hallar gran cantidad de materiales biodegradables y no biodegradables fruto de estas actividades antrópicas presentes en la zona, qué hace que la quebrada Manizales solo sea un conducto por el cual se realiza disposición final de residuos.

### **4.1.2 Aguas residuales domésticas**

Según la guía ambiental Gestión para el manejo, tratamiento y disposición final de aguas residuales domésticas (Minambiente, 2002) afirma:

El principal contaminador de las Aguas Residuales Domésticas (ARD) son las heces FECALES y la orina humana, seguido de los residuos orgánicos de la cocina; estas presentan un alto contenido de materia orgánica biodegradable y de microorganismos que por lo general son patógenos.

La materia orgánica (grasas, proteínas, carbohidratos) presente en las aguas residuales domésticas es biodegradada por los microorganismos, en condiciones aeróbicas cuando los cuerpos de agua no están altamente contaminados, o en condiciones anaerobias cuando se superan los niveles de asimilación, agotando el oxígeno disuelto, limitando la vida acuática y generando malos olores producto de los procesos de descomposición.

Las características físicas, químicas y bacteriológicas del agua residual de cada centro urbano varía de acuerdo con los factores externos como: localización, temperatura, origen del agua captada, entre otros; y a factores internos como la población, el desarrollo socioeconómico, el nivel industrial, la dieta en la alimentación, el tipo de aparatos sanitarios, las prácticas de uso eficiente de agua, etc, igualmente los vertimientos varían en su caudal en el tiempo, presentando a nivel doméstico mayores volúmenes especialmente en horas de comidas y de quehaceres domésticos.

### **4.1.3 Aguas residuales industriales**

Se definen como: “Todas las aguas residuales vertidas desde locales utilizados para efectuar cualquier actividad comercial o industrial, que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de escorrentía pluvial” (Rodríguez *et al.*, 2006).

Los efluentes industriales en general tienen un alto contenido de materia orgánica el cual es medido en forma de demanda biológica de oxígeno, demanda química de oxígeno o carbono orgánico total. Los valores de DQO tienen grandes diferencias entre los vertimientos domésticos y los vertimientos industriales, encontrándose que para las destilerías, queserías y empresas de aceites puede llegar a valores de 70.000, 35.000, 150.000 mg/l

respectivamente, mientras que las aguas domésticas pueden oscilar entre 120 y 300 mg/l (Merchuck, 1994).

Según la Guía ambiental Formulación de planes de pre-tratamiento de efluentes industriales (Minambiente, 2002), las empresas que mayor contaminación generan son:

Altas cargas orgánicas: empresas de alimentos, azúcares, curtiembres, jabones, productos de aseo personal, papel, glicerina, bebidas.

Altas cargas de sólidos: empresas de concreto, extractivas, curtiembres, sacrificios de aves y ganado.

Potencialmente contaminantes: empresas de curtiembres, metales y de productos químicos.

Corrosivos: empresas productoras de metales, textiles, de ácidos y fosfatos.

## 4.2 Plantas de tratamiento de aguas residuales

Se podría decir que son como sistemas o estructuras fabricadas para el desarrollo de procesos de depuración de manera controlada de tal manera que reduzca la cantidad de materia orgánica e inorgánica presente en los vertimientos de tal forma que al descargarla a los cuerpos de agua en la fuente receptora conserven los ecosistemas presentes allí.

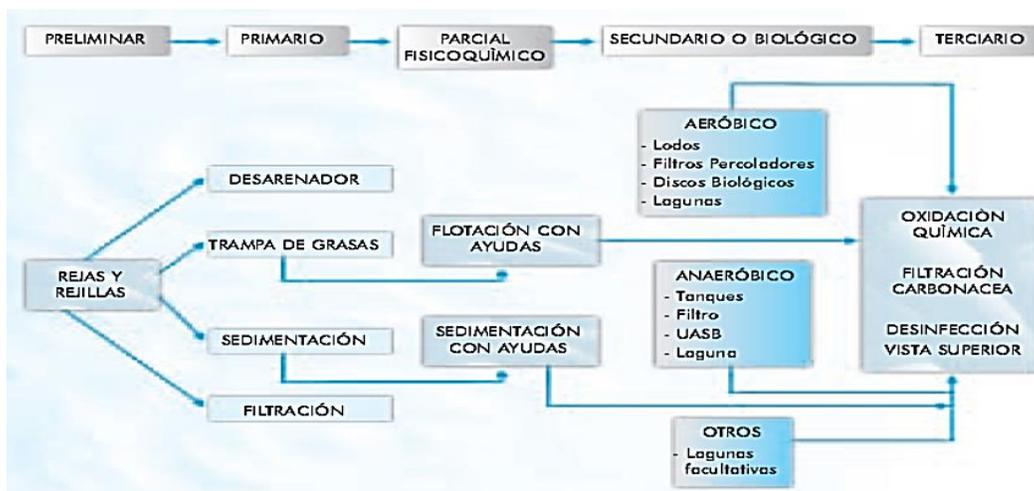


Figura 1. Sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales

Fuente: Guía Ambiental Formulación de planes de pretratamiento de efluentes industriales, (Minambiente, 2002).

Para realizar una eficiente remoción de contaminantes en una planta de aguas residuales es necesario aplicar procesos físicos, químicos y biológicos (Ver figura 1) que no alteren las condiciones ambientales de las fuentes receptoras, a continuación se describen los sistemas más comunes.

### **4.2.1 Sistemas de tratamiento de aguas residuales**

Dentro de los sistemas de tratamiento más comunes se pueden encontrar las siguientes etapas:

- **Pretratamiento:**

Debe realizarse por medio de procesos físicos y/o mecánicos, como rejillas, desarenadores y trampas de grasa, dispuestos convencionalmente de modo que permitan la retención y remoción del material extraño presente en las aguas negras y que pueda interferir los procesos de tratamiento. (Mindesarrollo, 2000).

- **Tratamiento primario:**

El objeto de este tratamiento es básicamente “la remoción de los sólidos suspendidos y DBO en las aguas residuales, mediante el proceso físico de asentamiento en tanques de sedimentación se pueden adicionar coagulantes para incrementar la eficiencia de remoción de fósforo, sólidos suspendidos y DBO” (Mindesarrollo, 2000).

- **Tratamiento secundario:**

El objetivo de un tratamiento secundario es remover la DBO soluble que escapa de un tratamiento primario, además de remover cantidades adicionales de sólidos suspendidos, estas remociones se efectúan fundamentalmente por medio de procesos biológicos. Los procesos biológicos, o secundarios, se emplean para convertir la materia orgánica fina coloidal y disuelta en el agua residual en floc biológico sedimentable y sólidos inorgánicos que pueden ser removidos en tanques de sedimentación. Estos procesos se emplean junto con procesos físicos y químicos para el tratamiento preliminar y primario del agua residual (Mindesarrollo, 2000).

DQO: medida de la cantidad de oxígeno requerido para oxidación química de la materia orgánica del agua residual, usando como oxidantes sales inorgánicas de permanganato o dicromato en un ambiente ácido y a altas temperaturas (Mindesarrollo, 2000).

DBO: cantidad de oxígeno usado en la estabilización de la materia orgánica carbonácea y nitrogenada por acción de los microorganismos en condiciones de tiempo y temperatura especificados (generalmente cinco días y 20 °C), mide indirectamente el contenido de materia orgánica biodegradable (Mindesarrollo, 2000).

Según la guía ambiental Formulación de planes de pre-tratamiento de efluentes industriales (Minambiente, 2002):

Cuando la relación DQO/DBO5 de las aguas residuales industriales es mayor que 5,0 son difícilmente tratables por medios biológicos y se consideran no degradables. Para valores entre 3,0 y 5,0 es necesario realizar estudios adicionales para establecer su degradabilidad, mientras que cuando esta relación es inferior a 3,0 las aguas son tratables por medios biológicos y se consideran degradables.

Dentro de los procesos biológicos se presentan dos tipos generales de sistemas de tratamiento de aguas residuales, los anaerobios y los aerobios que se definirán a continuación:

- **Sistemas anaerobios:**

El tratamiento anaerobio es el proceso de degradación de la materia orgánica (ver figura 2) por la acción coordinada de microorganismos, en ausencia de oxígeno u otros agentes oxidantes fuertes ( $\text{SO}_4^{=4}$ ,  $\text{NO}_3^{=3}$ , etc.), como subproducto de ella se obtiene un gas, denominado usualmente biogás, cuya composición básica es metano  $\text{CH}_4$  y dióxido de carbono  $\text{CO}_2$  en un 95%, pero con la presencia adicional de nitrógeno, hidrógeno, amoníaco y sulfuro de hidrógeno, usualmente en proporciones inferiores al 1% (Mindesarrollo, 2000).

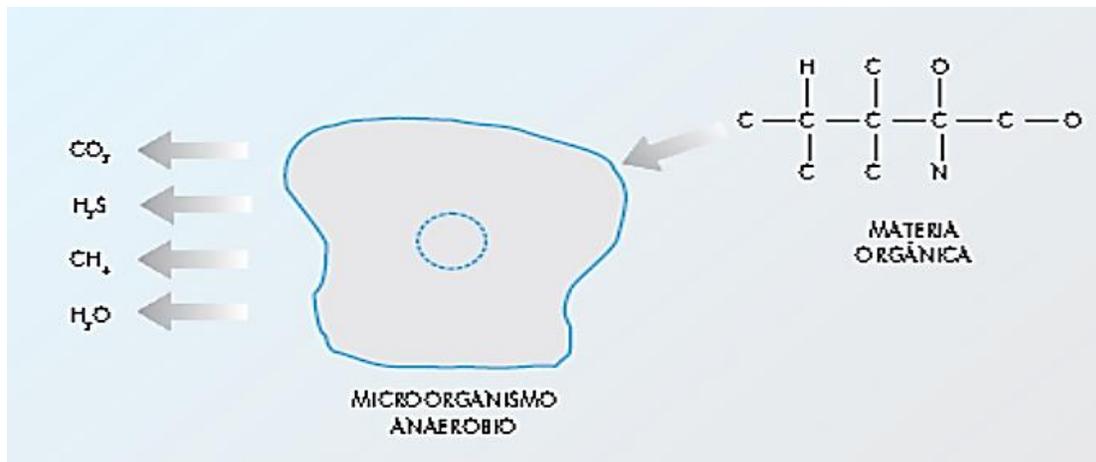


Figura 2. Proceso de tratamiento anaerobio

Fuente: Guía Ambiental Formulación de planes de pre-tratamiento de efluentes industriales (Minambiente, 2002).

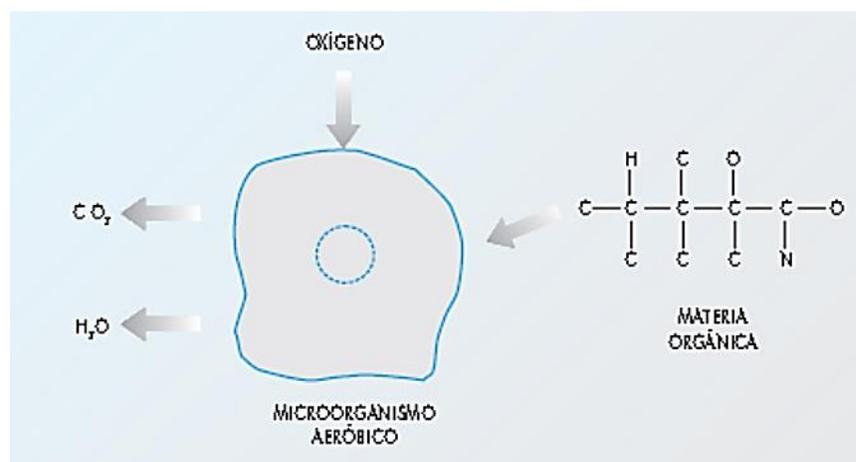
La degradación anaerobia de la materia orgánica requiere la intervención de diversos grupos de bacterias facultativas y anaerobias estrictas, las cuales utilizan en forma secuencial los productos metabólicos generados por cada grupo. La digestión anaerobia de la materia orgánica involucra tres grandes grupos tróficos y cuatro pasos de transformación:

El proceso se inicia con la hidrólisis de polisacáridos, proteínas y lípidos por la acción de enzimas extracelulares producidas por las bacterias del Grupo I (bacterias hidrolíticas). Los productos de esta reacción son moléculas de bajo peso molecular como los azúcares, los aminoácidos, los ácidos grasos y los alcoholes, los cuales son transportados a través de la membrana celular; posteriormente son fermentados a ácidos grasos con bajo número de carbonos como los ácidos acético, fórmico, propiónico y butírico, así como compuestos reducidos como el etanol, además de  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ . Los productos de fermentación son convertidos a acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por la acción de las bacterias del Grupo II, las cuales son conocidas como bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno. Finalmente las bacterias del Grupo III o metanogénicas convierten el acetato a metano y  $\text{CO}_2$ , o reducen el  $\text{CO}_2$  a metano. Estas transformaciones involucran dos grupos metanogénicos que son los encargados de llevar a cabo las transformaciones mencionadas anteriormente: acetotróficas e hidrogenotróficas. En menor proporción, compuestos como el metanol, las metilaminas y el ácido fórmico pueden también ser usados como sustratos del grupo metanogénico. (Díaz *et al.*, 2002).

- **Sistemas aerobios:**

Según la guía ambiental de Formulación de planes de pre-tratamiento de efluentes industriales (2002) los sistemas aerobios:

Los microorganismos aeróbicos requieren la presencia de oxígeno para su desarrollo y reproducción, cuando entran en contacto con las aguas residuales industriales usan las cadenas complejas de carbohidratos presentes en ellas como fuente alimenticia, estas son utilizadas en su metabolismo generando agua purificada y un gas inerte e inoloro como el  $\text{CO}_2$ ; puesto que casi siempre el desarrollo de los organismos está limitado por la falta de oxígeno disuelto en las aguas residuales, en los sistemas aerobios se busca proporcionar este elemento para que su crecimiento y reproducción sean los máximos posibles. (Ver figura 3).



**Figura 3. Proceso de tratamiento aerobio**

Fuente: Guía Ambiental Formulación de planes de pre-tratamiento de efluentes industriales (Minambiente, 2002).

Los procesos biológicos de tratamiento están fundamentados en la actividad de los microorganismos, es decir son aplicaciones de las actividades bioquímicas y fisiológicas de los microorganismos, ya que es la propia actividad metabólica de éstos, la que determina la degradación de la materia orgánica contaminante, dentro de esta actividad metabólica hay algunos microorganismos especializados en la producción de biopolímeros, como los productores de polihidroxicarboxilatos y los exopolisacáridos que aprovechan la fuente de

energía presentes en los vertimientos industriales en forma de cadenas carbonadas (Bernd, 2010).

### 4.3 Microorganismos

Por microorganismo entendemos cualquier organismo vivo que no sea visible a simple vista, esta definición operativa no incluye los hongos, tanto inferiores como superiores, ni las algas aunque ambos grupos son considerados microorganismo por su organización esencialmente unicelular; Por otra parte organismos pluricelulares o eucariotas pueden ser de tamaño tan pequeño que entren dentro de la definición anterior sin dejar por ello de ser estructuralmente tan complejos como cualquier animal superior, Existen varias clases de microorganismos: mohos, levaduras, bacterias, actinomicetos, protozoos, algas, virus. (Carrillo, 2003).

Los organismos eucariotas importantes en el tratamiento biológico de las aguas residuales “incluyen los hongos, los protozoos y los rotíferos, y las algas”. (Tchobanoglous, 1995).

Según Torres (2003): Existe la posibilidad del uso de bacterias con la propiedad de acumular o metabolizar metales pesados. La utilización de microorganismos que transforman diferentes compuestos nocivos en otros de menor impacto ambiental ha experimentado un gran desarrollo reciente. Aunque las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetes para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo.

Según Madigan *et al.* (2003): Un microorganismo de uso industrial debe producir la sustancia de interés; debe estar disponible en cultivo puro; debe ser genéticamente estable y debe crecer en cultivos a gran escala. Otra característica importante es que el microorganismo de uso industrial crezca rápidamente y realice su trabajo en un periodo corto de tiempo, debe crecer en un medio de cultivo económico que sea altamente disponible, y como característica principal, este no debe ser patógeno para el hombre o para los animales o plantas, otra característica importante de un organismo industrial es que debe crecer rápidamente y sintetice el producto deseado, en un periodo relativamente corto de tiempo, el microorganismo también debe ser capaz de crecer en un medio de cultivo líquido relativamente barato, que se obtenga en grandes cantidades, muchos procesos microbiológicos industriales utilizan productos de desecho carbonados provenientes de otras industrias, para los medios de cultivo a gran escala.

### 4.3.1 Características microscópicas

El estudio microscópico en fresco y tras tinción revela la forma, la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. Las tinciones son el primer paso, y ocasionalmente el único, para la identificación bacteriana. Las tinciones más utilizadas e imprescindibles son la del azul de metileno y la de Gram. La tinción de Gram es, a menudo, la primera y única herramienta de la que nos servimos para hacer un diagnóstico provisional en el proceso de identificación de la mayoría de las bacterias teniendo en cuenta también el tipo de muestra. Estos son algunos de los términos utilizados para preparaciones teñidas, tinción: uniforme, irregular, unipolar, bipolar, forma: cocos, bacilos, cocobacilos, filamentosos, bacilos curvos, cápsula: presente o ausente, endosporas: ovales, esféricas, terminales, subterminales, tamaño: cortos, largos, bordes laterales: abultados, paralelos, cóncavos, irregulares, extremos: redondeados, puntiagudos, disposición: parejas, cadenas, tétradas, racimos, formas irregulares: variación en forma y tamaño, ramificados, fusiformes. (Fernández *et al.*, 2010).

### 4.3.2 Características macroscópicas

Dentro de las características macroscópicas se encuentra la morfología de las colonias, que es fundamental en la identificación preliminar y en la diferenciación de los microorganismos. Para la observación morfológica es preferible examinar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos. En este paso de la identificación es muy importante el aislamiento de las bacterias en cultivo puro ya que esta deberá estar compuesta por un solo tipo de microorganismos y procederá de una única célula. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus características de tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color. El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie. La forma está determinada por los bordes y el grosor de la colonia. El borde puede ser liso o rugoso e irregular; la colonia, abultada o plana. La textura de la colonia es también importante. Puede variar desde seca a viscosa, con superficie lisa o granular. Algunos microorganismos producen una colonia pigmentada, lo que puede ser de ayuda en el proceso de identificación. (Fernández *et al.*, 2010).

### 4.3.3 Pruebas bioquímicas

Los cambios químicos que sufren los sustratos al ser asimilados por las bacterias son regulados por sistemas enzimáticos propios de cada tipo microbiano. Las técnicas metabólicas – microbiológicas actuales se fundamentan en el análisis de los cambios que sufren las sustancias nutritivas suministradas en forma bioasimilable, bajo concentraciones pre-establecidas en medios de cultivo específicos, así como también en la evaluación de los productos metabólicos de desecho los cuales son característicos de la vía metabólica adoptada por una bacteria, este comportamiento metabólico bacteriano está regido por tres factores: 1) Sustrato disponible, 2) Sistema enzimático (propio de cada especie) y 3) Condiciones ambientales reinantes. Dentro de las pruebas se encuentran: : TSI (Agar triple azúcar hierro), LIA (Agar hierro lisina), citrato de Simmons, urea, rojo de metilo, voges proskauer, SIM (Sulfuros Indol Motilidad), glucosa, sacarosa, gas a partir de glucosa, arabinosa, lactosa, manosa, ramnosa, xilosa, fructosa, ribosa, manitol, maltosa, galactosa, catalasa, oxidasa. (MacFADDIN, 1985).

## 4.4 Biopolímeros

### 4.4.1 Polihidroxicanoatos

Poli-L-hidroxitirato (PHB) es un polyester termoplástico. Es bio-compatible y biodegradable, y por lo tanto de interés industrial, en la célula, el PHB es un material de almacenamiento intracelular sintetizado durante condiciones de crecimiento desbalanceado, todas las bacterias capaces de sintetizar PHB lo acumulan durante la fase estacionaria de crecimiento; en la presencia de un exceso de fuente de carbono y con un crecimiento limitado por otro nutriente como por ejemplo el nitrógeno, el ácido poli(R)-3-hidroxitirico (PHB) es el polyester más abundante en bacterias, consta de un solo tipo de monómero 3-hidroxitirato (3HB) (Ashm *et al.*, 1998).

Sin embargo, cerca de 150 ácidos hidroxicanoicos (HA) diferentes al 3HB han sido identificado como constituyentes de microorganismos. Los PHA difieren de los polímeros producidos quimio-sintéticamente tales como el polietileno o polipropileno por su síntesis a partir de fuentes renovables y por su fácil biodegradabilidad a agua y dióxido de carbono (Jendrossek & Handrick, 2002).

Según Kumar (2008) los polihidroxicanoatos son poliésteres de varios hidroxialcanoatos, hidroxilados en las posiciones 3, 4, 5 y 6 los cuales forman moléculas quirales (Figura 4) que son sintetizadas por muchas bacterias gram positivas y Gram negativas de cerca de 75 géneros diferentes.

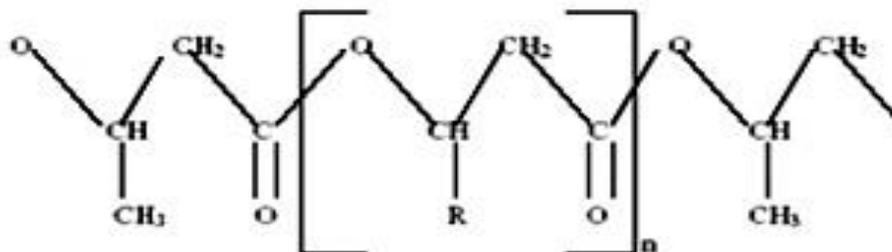


Figura 4. Formula estructural de los PHA

Fuente: Studies on microbial degradation of biological wastes for production of polyhydroxyalkanoates. (Kumar, 2008).

Los PHB son estructuras perfectamente isotácticas. Los P(3HB) aislados de bacterias poseen del 55 al 80% de cristalinidad, los PHB fueron los primeros PHA descubiertos en especies de *Bacillus*, por tanto es el más ampliamente estudiado y mejor caracterizado de los PHA; el peso molecular de ese rango de compuestos va desde  $2 \times 10^5$  a  $3 \times 10^6$  Da. Dependiendo del número de átomos de carbono en la unidad monomérica, los PHAs pueden ser divididos en tres grupos: 1) PHAs de cadena corta (scl-PHAs); los cuales constan de 3 a 5 átomos de carbonos, 2) PHAs de cadena media (mcl-PHAs); los cuales constan de 6 a 14 átomos de carbono y 3) PHAs de cadena larga (lcl-PHAs), los cuales constan de 17 y 18 átomos de carbono. (Kumar, 2008).

- **Microorganismos productores de PHA:**

Son sintetizados por muchos organismos vivos, los principales candidatos por la producción a gran escala son las plantas y las bacterias; las células vegetales tienen un bajo rendimiento en la producción de PHA. El PHA es acumulado de forma natural por las bacterias como fuente de energía y carbono, cuando las fuentes de nutrientes no están balanceadas (Verlinden *et al.*, 2007).

Son producidos por diversos cultivos bacterianos, *Cupriavidus necator* es uno de los que más ampliamente ha sido estudiado. Otras cepas que han sido estudiadas más recientemente incluyen: *Bacillus sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Escherichia coli*, *Burkholderia sacchari* y *Halomonas boliviensis*. (Kumar, 2008).

Frecuentemente, los PHAs son producidos a escala industrial usando exclusivamente bacterias Gram negativas (tales como *Wautersia eutropha*, *Methylobacterium organophilum*, *Pseudomonas oleovorans* y *Escherichia coli* recombinante) (Valappil *et al.*, 2007).

Especies de cerca de 75 géneros son conocidas por ser capaces de sintetizar PHB; a pesar del hecho que se detectó también PHB en actinomicetos y levaduras, es más frecuentemente acumulado por bacterias de distintos grupos morfológicos y fisiológicos. Únicamente el monómero fue detectado en el micelio de micromicetos. La producción de PHB por los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Pediococcus* no ha sido bien estudiada y documentada. (Ashm *et al.*, 1998).

#### ▪ **Aplicaciones médicas y farmacéuticas:**

Según Kumar, (2008); El producto de la degradación del P(3HB), el ácido D-3-hidroxitirico es un compuesto metabólico intermedio presente en todos los organismos superiores; por lo tanto, es posible que este sea biocompatible a los tejidos animales y el P(3HB) pueda ser implantado en tejidos animales sin consecuencias toxicas, algunas aplicaciones de los PHAs bacterianos en el área médica y farmacéutica incluyen: portador biodegradable de dosis de drogas a largo tiempo, dentro del cuerpo, suturas y escobillones, clavos quirúrgicos, apósitos para heridas, placas y reemplazos óseos, reemplazos de vasos sanguíneos y estimulación del crecimiento de hueso, y curación por propiedades piezoeléctricas.

#### ▪ **Aplicaciones en la agricultura**

Según Kumar, (2008): Son biodegradables en el suelo, sin embargo, el uso de PHAs en agricultura es muy promisorio; ellos pueden ser usados como portadores biodegradables para dosis de largo tiempo de insecticidas, herbicidas, o fertilizantes, contenedores para plantas de semillero, plásticos para proteger las vainas, matriz biodegradable para drogas empleadas en medicina veterinaria y tubería para irrigación de cultivos.

- **Empaquetado biodegradable de material**

Según Kumar, (2008); Los PHA tienen un amplio rango de aplicaciones debido a sus nuevas características, han sido utilizados en películas para empaquetado principalmente en bolsas, contenedores y recubrimientos de papel, aplicaciones similares como plásticos para materias primas incluyen los artículos desechables tales como, maquinillas de afeitarse, utensilios, pañales, productos de higiene femenina, contenedores cosméticos, botellas para shampoo y copas.

#### **4.4.2 Exopolisacáridos**

Los exopolisacáridos microbianos son biopolímeros constituidos principalmente por unidades glucídicas, producidos por microorganismos (bacterias, levaduras, hongos y arqueas bacterias) localizados en el exterior de la célula microbiana, en las cubiertas microbianas más externas glicocálix y a veces se encuentran desligados de la célula; la presencia de exopolisacáridos asociados a células microbianas, se pone de manifiesto por la mucosidad de las colonias y la viscosidad en medios líquidos (Madieto & Gavilán, 2005).

La clasificación de los polisacáridos se puede realizar según Paris (2009):

En función de diversos criterios; según el grado de asociación a la membrana se dividen en polisacáridos capsulares y libres, según su estructura y composición en homopolisacáridos y heteropolisacáridos, según el microorganismo productor; sean bacterias, hongos, levaduras, arqueas y según el mecanismo de síntesis se dividen en: extracelular, intracelular.

- **Composición química de los exopolisacáridos**

Generalmente, los exopolisacáridos están compuestos en su mayoría por carbohidratos, pudiendo presentar sustituyentes orgánicos e inorgánicos además de azúcares (Sutherland, 1988).

- **Carbohidratos**

En los polisacáridos microbianos encontramos una gran diversidad de carbohidratos, siendo los azúcares D-glucosa, D-galactosa y D-manosa en su forma piranósica los monosacáridos que más se repiten en estos polímeros. Las 6- desoxihexosas, L-fucosa y L-ramnosa están presentes frecuentemente. (Paris, 2009).

Algunos polisacáridos pueden contener uno o más azúcares raros, tales como L-hexosas o formas furanósicas de las hexosas, glucosa y galactosa. (Lemoine *et al.*, 1997)

La naturaleza polianiónica de la mayoría de estos polisacáridos es debida a la presencia de ácidos urónicos, siendo más común el ácido glucurónico. La presencia de ácidos urónicos les confiere la capacidad de unir cationes bivalentes, pudiendo ser empleados en procesos de detoxificación y tratamiento de aguas residuales. (Paris, 2009).

- **Sustituyentes orgánicos**

El acetato es el componente orgánico más común unido por enlace éster, aunque no contribuye a la carga total de la molécula polisacáridica.

El piruvato está presente en proporciones estequiométricas con los componentes azucarados del exopolisacárido y unido a una hexosa neutra, aunque en ocasiones se encuentra unido a ácidos urónicos, contribuyendo a la carga aniónica de la molécula.

Grupos succinil y acetilo se han encontrado en el exopolisacárido de ciertas especies de bacterias *Rhizobium* y *Agrobacterium*. (Amemura & Harada, 1983).

En lo que se refiere al contenido en grupos acilo en algunos polisacáridos, éste puede ser relativamente alto, encontrándose en proporciones estequiométricas relativas a los monosacáridos presentes, aunque en algunas ocasiones los polisacáridos contienen sustituyentes acilo en unidades repetidas alternativamente. (Paris, 2009).

- **Sustituyentes inorgánicos**

Los aniones sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) son sustituyentes inorgánicos junto con los cationes, formando parte de los polímeros polianiónicos. Algunos alginatos llevan fuertemente unido los cationes bivalentes  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ , estos iones se adhieren al polisacárido durante su producción, aunque pueden ser desplazados por procesos como intercambio iónico, electrodiálisis, permitiendo la conversión de ácido a sal. (Sutherland, 1988).

- **Aplicaciones en productos alimentarios**

Los polisacáridos presentan gran cantidad de propiedades útiles para diversas aplicaciones en el sector alimentario; se emplean como agentes estabilizantes, texturizantes y gelificantes. (Sanderson & Clarke, 1983).

Aunque existen pocos EPS aprobados para el uso en alimentación, se encuentran en la elaboración de gelatinas, golosinas y postres de leche, salsas, almíbares y rellenos de tarta.

Estos compuestos se añaden para el control de la textura del alimento y en la prevención de la formación de cristales de hielo en productos congelados, influyendo en la presentación del producto final comestible, algunos se emplean como saborizantes, existiendo una relación específica entre el polisacárido presente y el sabor de un alimento. (Paris, 2009).

La producción de compuestos saborizantes. El furanol es un agente saborizante producido a partir de desoxiazúcares extraídos de exopolisacáridos microbianos, ampliamente utilizado en comidas y bebidas. (Roller & Dea, 1992).

Los desoxiazúcares son producidos por bacterias como *Klebsiella sp.*, *Escherichia sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Bacillus sp.* y *Rhizopus sp.* (Graber *et al.*, 1992).

#### ▪ **Aplicaciones industriales**

En la extracción del petróleo, los EPS microbianos se emplean en el llenado y en el proceso de recuperación del petróleo actuando como viscosificantes. Se requiere el empleo de un fluido con comportamiento pseudoplástico, donde la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizalla. Durante la operación de perforación, las soluciones deben ser lo suficientemente fluidas para facilitar el bombeo de la mezcla, y cuando la operación se detiene, la viscosidad debe aumentar para que los sólidos se mantengan en suspensión y poder ser estables bajo condiciones extremas de temperatura y pH. Tanto la goma xantana como el succinoglucano, se emplean como aditivos en muchas etapas del proceso de perforación, producción, transporte y procesamiento de crudo. (Paris, 2009)

Por otro lado, el pululano se emplea en la fabricación de recubrimientos comestibles cuya función es aumentar la vida útil del producto, además de combinarse con polietilenglicol para facilitar y reducir los costes de extracciones enzimáticas. Por otro lado, los alginatos bacterianos se emplean en la industria textil. (Sutherland, 1990).

#### ▪ Aplicaciones farmacéuticas y médico- veterinarias

El dextrano es uno de los polisacáridos que desde hace largo tiempo posee una aplicación médica; actualmente se produce comercialmente por la bacteria *Leuconostocmes enteroides* a partir de un proceso de fermentación en un medio basado en sacarosa. (Kim *et al*, 2003).

Otras aplicaciones médicas se basan en la explotación de las propiedades biológicas del dextrano, actuando como agentes antivirales y antitumorales. Son de destacar, las líneas de investigación que emplean curdlano modificado (curdlano químicamente sulfatado modificado con un derivado de palmitol) para recubrir vesículas y preparar liposomas recubiertos con derivados de curdlano, con el objetivo de estabilizar los liposomas contra los fluidos gástricos para un potencial uso oral. (Moon & Lee, 2004).

#### ▪ Aplicaciones en biorremediación medioambiental

La mayoría de los biopolímeros muestran una capacidad de biorremediación con uniones y retención de metales pesados. Numerosos estudios demuestran que disoluciones de biopolímeros pueden extraer metales pesados por quelación, reducción, precipitación, intercambio iónico. La capacidad de extracción de metales pesados de la bacteria *Zooglea ramigera* ha sido ampliamente estudiada; esta, es una bacteria productora de exopolisacárido y se encuentra en el tratamiento de aguas residuales. (Bramucci & Nagarajan, 2000).

### 4.4.3 Biosíntesis de polímeros bacteriales

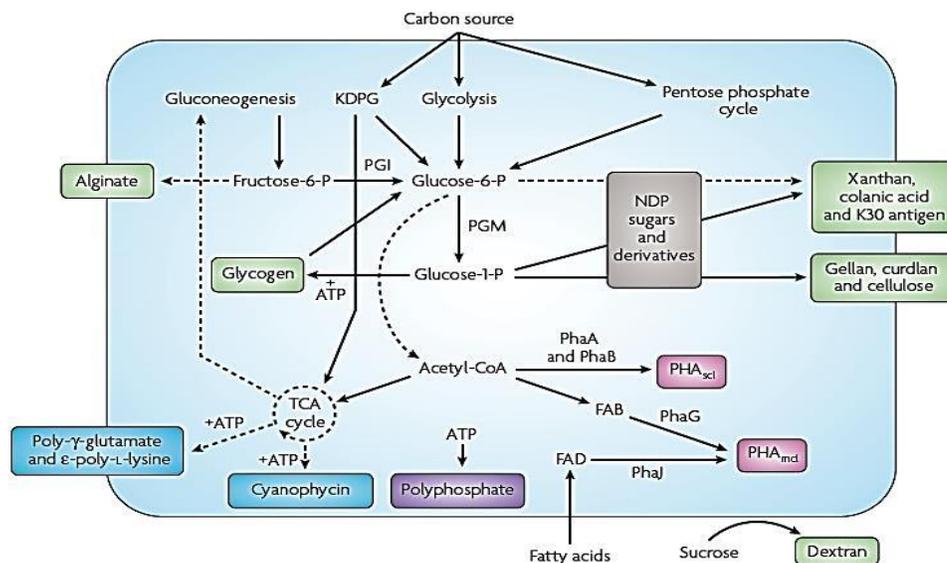


Figura 5. Principales rutas metabólicas hacia la síntesis de varios polímeros

Fuente: Rehm, 2010.

En la figura 5, las líneas solidas indican las rutas metabólicas primarias vinculadas con polímeros precursores intermediarios. Las líneas punteadas indican que existen pasos enzimáticos múltiples; los polisacáridos se muestran en los recuadros verdes, los poliésteres en recuadros rosados, poliamidas en recuadros azules y los polianhídridos inorgánicos en color lila. (Rehm, 2010).

## 5. Antecedentes

La emisión de efluentes es un problema ambiental de gran importancia en los países industrializados. “Las técnicas convencionales de tratamiento de efluentes implican utilizar procesos y productos costosos que generalmente deterioran el ambiente y generalmente dejan remanentes que requieren de tratamientos más complejos” (Abril, 2005).

En los últimos años, se han desarrollado tecnologías alternativas para el tratamiento de efluentes conocidas como biorremediación. La biorremediación es un proceso que utiliza microorganismos para transformar sustancias peligrosas en compuestos no tóxicos o menos peligrosos. (Arellano, 2002).

Con la introducción de bacterias a los sistemas de depuración se busca aumentar la velocidad de degradación de los contaminantes, pero si las bacterias son exógenas al sistema suelen perder su capacidad de degradación debido a problemas de adaptación frente a las condiciones de campo. (Abril, 2005).

Si bien los sistemas de biorremediación están siendo utilizados con éxito en países desarrollados, la aplicación de estas tecnologías en Colombia es incipiente y de carácter experimental. Probablemente esto se deba a que el éxito de los tratamientos de biorremediación depende no solo de la introducción de especies (bacterias o plantas) sino también del manejo integrado del ecosistema. Por tal motivo es nuestro interés desarrollar metodologías que se adapten a las condiciones ecológicas de cada ambiente en particular.

Para el año 2003, según la Corporación andina de Fomento (CAF):

En Colombia participan 62 grupos en actividades de investigación sobre recursos fitogenéticos, que representan más de 45% del total. Otros 12 grupos realizan investigaciones

sobre temas relacionados con el medio ambiente y la industria. Las investigaciones sobre los microorganismos son las menos desarrolladas equivalentes al 4% así mismo señala que ninguno de estos grupos ha avanzado en el área de los negocios biotecnológicos derivados de los productos naturales.

Actualmente la información que se encuentra registrada en el banco de patentes relacionada con biopolímeros, reportada por la Superintendencia de Industria y comercio correspondiente a patentes publicadas en Colombia son:

Geles degradables en aplicaciones de aislamiento zonal., expediente 7 105875.

Proceso de recuperación de aceite que emplea porción de inyección previa que contiene polímero, expediente 92 144698.

Proceso mejorado de recuperación de hidrocarburos líquidos, expediente 92 356243.

Fluido para taladrar basado en agua y una arcilla gelenate., expediente 98 18304.

Biopolímeros con base en lactococcus lactis NRRL B-30656, el proceso para el cultivo de lactococcus lactis NRRL y el proceso para la producción del biopolímero, expediente 3 112173.

Ensayo homogéneo de unión de biopolímero por medio de mediciones múltiples bajo condiciones variadas., expediente 4 15669.

Composición limpiadora antimicrobial, expediente 6 26807.

Bajo este contexto las investigaciones patentadas y publicadas en el tema de biopolímeros son muy escasas y no se encuentran trabajos realizados con respecto al aislamiento de bacterias nativas de cada vertimiento para su propio tratamiento.

## **6. Estrategia metodológica**

Este proyecto investigativo se realizó teniendo en cuenta un diseño exploratorio experimental con enfoque cuantitativo, con el cual se determinaron valores de remoción de S.S.T., DQO y DBO<sub>5</sub> haciendo uso de bacterias nativas productoras de PHA y EPS de cada uno de los vertimientos a analizar.

Con el fin de dar inicio a lo planteado en esta investigación y cumplir con el alcance que esta tiene, fue necesario partir de los aislados seleccionados, debidamente codificados y conservados de cada una de las empresas objeto de estudio, los cuales fueron entregados por los investigadores de Tecnoparque SENA nodo Manizales y la Universidad Católica de Manizales quienes realizaron la exploración de diferentes ambientes en el sector industrial, para la obtención de bacterias productoras de biopolímeros intracelulares (PHA) y extracelulares (EPS), descripción macroscópica y microscópica, caracterización bioquímica y conservación de los aislados productores.

### **6.1 Selección de los aislados que presenten mayor producción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos en medio sintético**

#### **6.1.1 Extracción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos en medio sintético**

Se estimó la producción de biopolímeros con los aislados obtenidos, aplicando un diseño experimental con tres réplicas por aislado.

Se utilizó un medio de cultivo sintético enriquecido con glucosa para la medición de producción de PHA (Fernández *et al.*, 2005) con modificaciones, el cual consistió en inocular en el sustrato sintético el aislado objeto de estudio a una concentración de  $9 \times 10^8$  bacterias por cada mililitro, valor 3 según la escala nefelométrica de Mc Farland (Fernández *et al.*, 2005), por un periodo de 24, 48 y 72 horas, en cada periodo de incubación el precipitado recuperado de centrifugación se resuspendió en hipoclorito de sodio con 5% de cloro libre y EDTA 10 mili molar (mM), se incubaron a 60 °C durante un periodo de 1,5 horas, se centrifugaron y se lavaron con agua destilada. El sedimento se resuspendió en acetona, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en metanol frío, centrifugando nuevamente y descartando el sobrenadante, recuperando el precipitado (Ver anexo A).

Para la medición de la producción de EPS Se utilizó un medio de cultivo sintético enriquecido con sacarosa (Torres *et al.*, 2011) con modificaciones, el cual consistió en dejar el sustrato sintético con el aislado objeto de estudio durante 72 horas, se centrifugó, tomando el sobrenadante y se adicionó 2 volúmenes de etanol al 70%, se almacenó a 4 °C durante 12 horas, pasado este tiempo, se centrifugó descartando el sobrenadante y se secó la biomasa precipitada a temperatura ambiente (Ver anexo B) .

### **6.1.2 Determinación de las diferencias bioquímicas de los aislados seleccionados**

Con el fin de garantizar que los aislados tenían características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas diferentes, se partió de resultados obtenidos en el laboratorio de biotecnología de Tecnoparque nodo Manizales y se realizaron los comparativos de características microscópicas como: tinción de Gram, tinción de sudan negro, tinción negativa; características macroscópicas como: forma, margen, elevación, superficie, textura, propiedad óptica, tamaño, configuración, color; pruebas bioquímicas como: TSI, LIA, citrato de Simmons, urea, rojo de metilo, voges proskauer, SIM, glucosa, sacarosa, gas a partir de glucosa, arabinosa, lactosa, manosa, ramnosa, xilosa, fructosa, ribosa, manitol, maltosa, galactosa, catalasa, oxidasa.

### **6.1.3 Cinética de crecimiento de los aislados seleccionados**

Una vez se determinaron las bacterias con mayor producción de PHA y EPS y de características diferentes, se procedió a realizar la cinética de crecimiento de estos aislados

en medio sintético, evaluando densidad óptica a 600 nm y el comportamiento del pH. Las bacterias se evaluaron de forma individual y en consorcio. (Becker, 1996).

## **6.2 Ensayo piloto en biorreactores tipo batch**

Se realizó el montaje de biorreactores tipo batch en envases plásticos de 2 litros con un volumen de trabajo de 1,2 litros, provistos con inyección de aire de forma ascendente, inoculados al 10% con un aislado nativo productor de PHA, un productor de EPS a una concentración de  $9 \times 10^8$  bacterias por cada mililitro, valor 3 según la escala nefelométrica de Mc Farland (Fernández *et al.*, 2005) y la mezcla de estas dos en la muestra del vertimiento, a fin de determinar los posibles ajustes a la prueba definitiva (Ver anexo C).

A estos biorreactores se les realizó un monitoreo de los siguientes parámetros: temperatura, pH, oxígeno disuelto, sólidos disueltos totales, turbidez y porcentaje de sedimentación a fin de determinar los puntos de toma de muestras según el comportamiento del pH vs turbidez y porcentaje de sedimentación.

## **6.3 Evaluación de la remoción en niveles de S.S.T, DQO y DBO<sub>5</sub>, a escala de laboratorio**

### **6.3.1 Caracterización fisicoquímica de los afluentes de las empresas objeto de investigación**

Se realizó un muestreo compuesto por empresa en tres momentos, donde se tomó muestras en un día de producción, cada hora, durante 4 horas a la entrada del sistema de tratamiento de aguas residuales.

Las variables analizadas fueron: temperatura, pH, conductividad, oxígeno disuelto, mediante equipo portátil multiparámetro WTW 3430 SET F, SST por método gravimétrico, DBO<sub>5</sub> mediante equipo OXI700 BOD System, DQO, Carbono orgánico total (COT), ortofosfatos con equipo NANOCOLOR UV/VIS MN Since 1911, nitrógeno mediante método Kjeldhal y aforo

de caudal por volumetría, con el fin de conocer las características del afluente de la empresa en estudio.

### **6.3.2 Montaje de reactores batch**

Se realizó el montaje de un biorreactor por cada aislado seleccionado, un biorreactor para el consorcio de los dos aislados productores de PHA, un biorreactor para el consorcio de los dos aislados productores de EPS, un biorreactor con la mezcla de las cuatro aislados seleccionados, todos estos reactores se montaron con el sustrato crudo; por último se realizó el montaje de un biorreactor control con efluente crudo sin inocular (Ver anexo D).

Cada reactor se preparó con un volumen de trabajo de 1,2 L de los cuales 1,08 corresponde a la muestra y 0,12 L o sea el 10% del volumen de trabajo corresponde al inóculo con el aislado a una concentración de  $9 \times 10^8$  bacterias por cada mililitro, valor 3 según la escala nefelométrica de Mc Farland (Fernández *et al.*, 2005)

Una vez hecho el montaje de los biorreactores, se hizo un seguimiento al pH, donde se tomaron muestras en el punto más bajo de la curva y en el punto de estabilización del mismo, con estas muestras se evaluó los SST, DQO y DBO<sub>5</sub>, con el fin de determinar la tasa de remoción.

## **6.4 Determinación de la relación entre los niveles de remoción de los aislados seleccionados y la producción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos**

Una vez se determinado el punto final de remoción de los aislados se estimó la producción de biopolímeros, haciendo mediciones de producción de PHA y EPS por cada uno de los biorreactores montados de acuerdo a la metodología mencionada anteriormente, resultados con los cuales se realizó la relación de niveles de remoción de SST, DQO y DBO<sub>5</sub> con respecto a la producción de PHA y EPS.

## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Selección de los aislados que presentan mayor producción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos en medio sintético

#### 7.1.1 Extracción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos en medio sintético

- Extracción de Polihidroxicanoatos

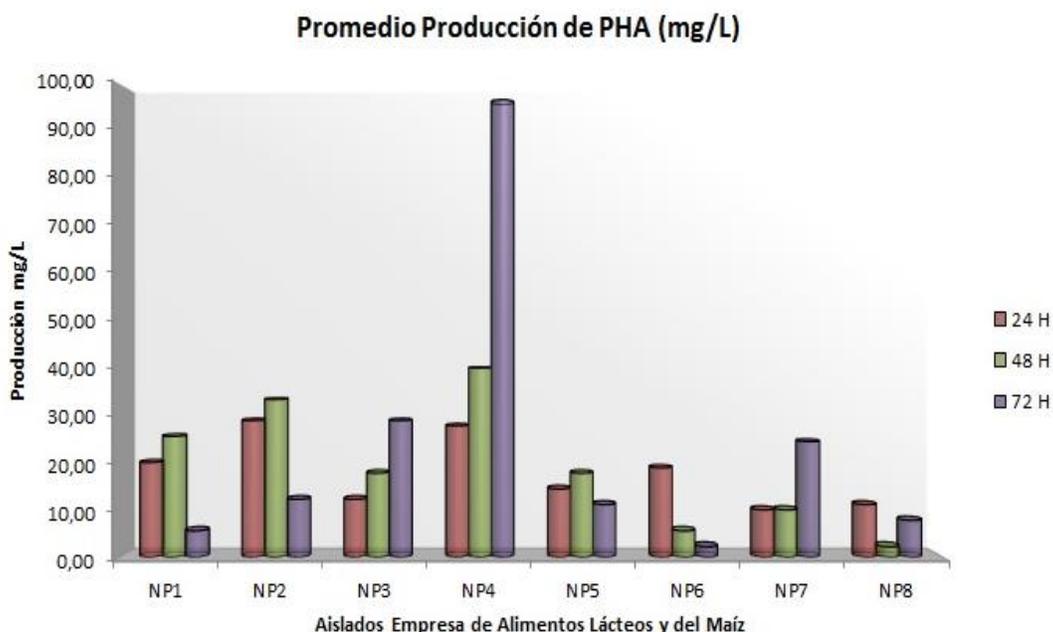
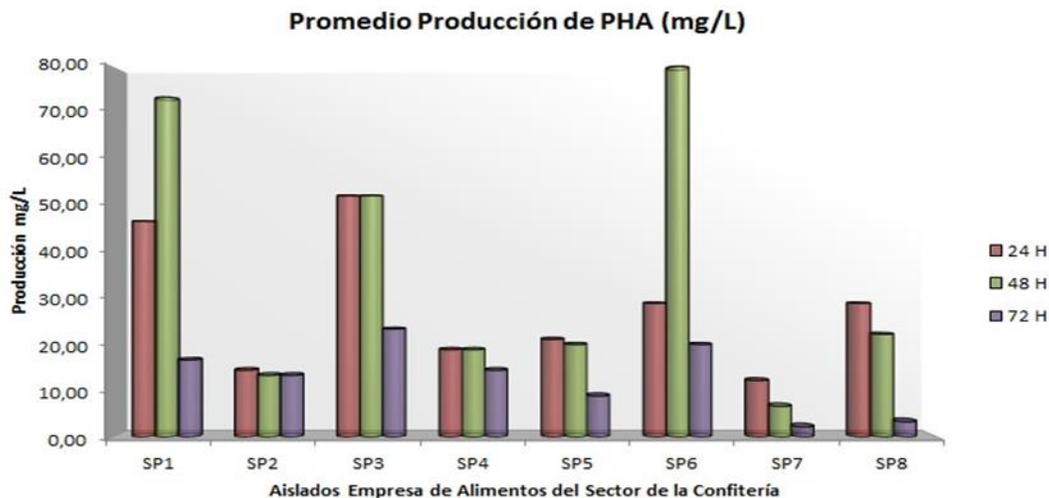


Figura 6. Producción de PHA en miligramos / litro a las 24, 48 y 72 horas de 8 aislados provenientes de una empresa de alimentos lácteos y del maíz.



**Figura 7. Producción de PHA en gramos / litro a las 24, 48 y 72 horas de 8 aislados provenientes de una empresa de alimentos del sector de la confitería**

Con el fin de conocer el potencial de producción de cada uno de los aislados obtenidos por cada una de las empresas objeto de esta investigación se procedió a realizar la medición de producción de PHA (Fernández *et al.*, 2005) con modificaciones, de la empresa de lácteos y del maíz se obtuvo 8 aislados a los cuales se les realizó un análisis de producción de PHA, obteniendo los resultados mostrados en la figura 6, después de realizar extracción a las 24, 48 y 72 horas, con estos resultados se seleccionaron los aislados identificados como NP2 y NP4 por presentar mayor producción en su punto máximo, obteniendo 33,33 mg/l y 96,67mg/l respectivamente, de igual manera de la empresa de alimentos del sector de la confitería se obtuvo 8 aislados a los cuales se les realizó este mismo análisis, obteniendo los resultados mostrados en la figura 7 después de realizar extracción a las 24, 48 y 72 horas. Con estos resultados se seleccionaron los aislados identificados como SP1 y la SP6 por presentar mayor producción en su punto máximo, obteniendo 73,33 mg/l y 80 mg/l respectivamente; (Otero, 2012) utilizando esta misma metodología en aguas residuales domésticas de la ciudad de Pasto encontró dos cepas con una producción de 5,24 g/l y 3,86 g/l, de PHA.

- **Extracción de Exopolisacáridos**

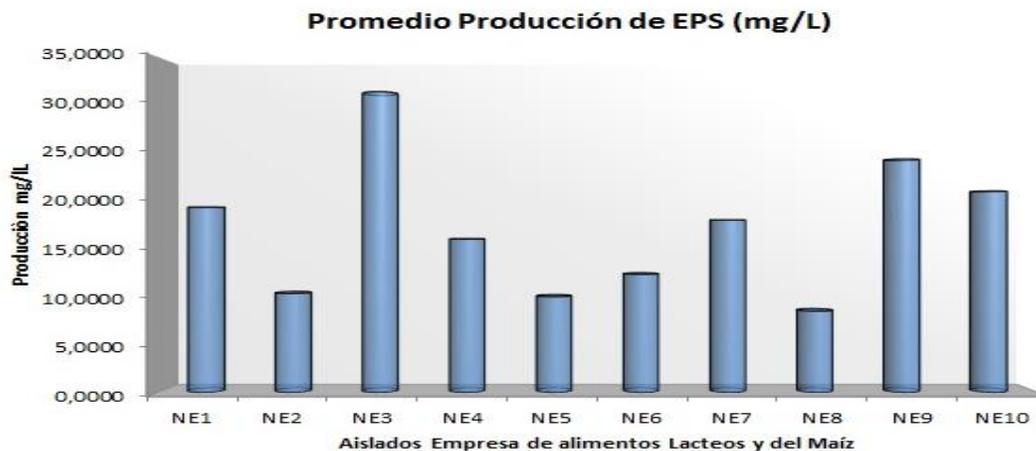


Figura 8. Producción de EPS en miligramos / litro a las 72 horas de 10 aislados provenientes de una empresa de alimentos lácteos y del maíz.

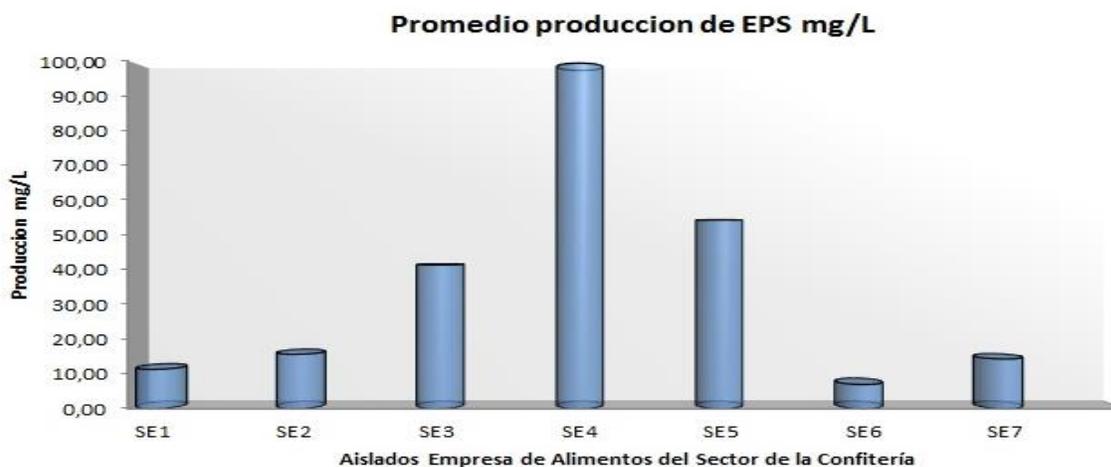


Figura 9. Producción de EPS en gramos / litro a las 72 horas de 10 aislados provenientes de una empresa de alimentos lácteos y del maíz.

Los resultados obtenidos al analizar el potencial de producción de cada uno de los aislados obtenidos se pueden observar en las figuras 8 y 9, donde de la empresa de alimentos del sector de la confitería se obtuvo 7 aislados, a los cuales se les realizó un análisis de producción de EPS y después de 72 horas de inoculados en sustrato sintético enriquecido

con sacarosa según (Torres *et al.*, 2011) con modificaciones se seleccionaron los aislados identificados como SE4 y SE5 por presentar una producción mayor a los demás, de 99,33 mg/l y 54,33 mg/l al cabo de tres días, de igual manera para la empresa de lácteos y del maíz se siguió el mismo procedimiento para diez aislados obtenidos que al cabo de 72 horas se seleccionaron los aislados identificados como NE3 y NE9 por presentar una producción mayor a la de los demás, de 33,33 mg/l y 24,33 mg/l después de tres días. Torres *et al* en el 2011 reportó una producción de EPS de 400 mg/l y 1600 mg/l para dos aislados de bacterias ácido lácticas obtenidas a partir de suero de leche fresco, de una empresa de lácteos; lo que permite tener un referente en la producción de biopolímeros de tipo exopolisacáridos siguiendo el mismo procedimiento de extracción. En este punto es importante aclarar que al momento de realizar la activación para de los aislados para su posterior análisis, se tuvo dificultad con el SE5, el cual no fue posible recuperar, por tal motivo se procedió a utilizar el SE3, con el cual se realizaron todas las pruebas.

#### ▪ Comparativo de las pruebas bioquímicas de los aislados seleccionados

De acuerdo a los aislados seleccionados se realizó un comparativo de 22 pruebas bioquímicas en las que se encuentran TSI, LIA, citrato de Simmons, urea, rojo de metilo, voges proskauer, SIM, glucosa, sacarosa, gas a partir de glucosa, arabinosa, lactosa, manosa, ramnosa, xilosa, fructosa, ribosa, manitol, maltosa, galactosa, catalasa, oxidasa.

Con el fin de disminuir el riesgo de trabajar con aislados iguales se realizaron estas pruebas bioquímicas que permiten diferenciar cada aislado de acuerdo a su metabolismo, cuando se expone a un sustrato y ambientes específicos. En la tabla 1 y 2 se muestran las diferencias encontradas.

**Tabla 1. Pruebas bioquímicas de los aislados productores de PHA escogidos para una empresa de alimentos lácteos y del maíz**

TIPO DE POLIMERO	AISLADO	TSI	LIA		CITRATO DE SIMMONS
		GAS	RESULTADO	LISINA	
PHA	NP2	-	A/A	-	-
	NP4	+	K/K	+	+
		VOGES PROSKAUER 72h	SIM	GAS A PARTIR DE GLUCOSA	CATALASA
			MOTILIDAD		
PHA	NP2	-	-	-	-
	NP4	+	+	+	+

Fuente: Laboratorio de biotecnología – Tecnoparque nodo Manizales

Tabla 2. Pruebas bioquímicas de los aislados productores de EPS escogidos para una empresa de alimentos lácteos y del maíz

TIPO DE POLIMERO	AISLADO	VOGES PROSKAUER 72h	SIM	CATALASA
			INDOL	
EPS	NE3	+	-	+(d)
	NE9	-	+	-

Fuente: Laboratorio de biotecnología – Tecnoparque nodo Manizales

Para el caso de los aislados productores de PHA escogidos se encontraron diferencias en 8 pruebas bioquímicas (ver tabla 1) y para los aislados productores de EPS se encontraron diferencias en 3 pruebas bioquímicas (ver tabla 2) de las 22 aplicadas.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas de los aislados productores de PHA escogidos para una empresa de alimentos del sector de la confitería

TIPO DE POLIMERO	AISLADO	LIA		ROJO DE METILO 48h	GAS A PARTIR DE
		RESULTADO	LISINA		
PHA	SP1	K/A	-	-	-
	SP3	K/K	+	+	+
		ARABINOSA	XILOSA	RIBOSA	OXIDASA
PHA	SP1	-	+	+	+
	SP3	+	-	-	-

Fuente: Laboratorio de biotecnología – Tecnoparque nodo Manizales

Tabla 4. Pruebas bioquímicas de los aislados productores de EPS escogidos para una empresa de alimentos del sector de la confitería

TIPO DE POLIMERO	AISLADO	UREA	ROJO DE METILO 48h	VOGES PROSKAUER
EPS	SE3	-	-	+
	SE4	+	+	-
		GAS A PARTIR DE	ARABINOSA	RIBOSA
EPS	SE3	+	+	+
	SE4	-	-	-

Fuente: Laboratorio de biotecnología – Tecnoparque nodo Manizales

Según los resultados obtenidos en la tabla 3 se puede evidenciar diferencia en 8 pruebas bioquímicas para los aislados productores de PHA, mientras que para los

productores de EPS, se encontraron 6 diferencias en la pruebas como se observa en la tabla 4, para estos aislados se aplicaron 22 pruebas bioquímicas.

La totalidad de los resultados obtenidos se pueden consultar en los anexos E y F.

## 7.2 Estudio de cinética de crecimiento en medio sintético

### 7.2.1 Aislados seleccionadas en la empresa de alimentos del sector de los lácteos y el maíz

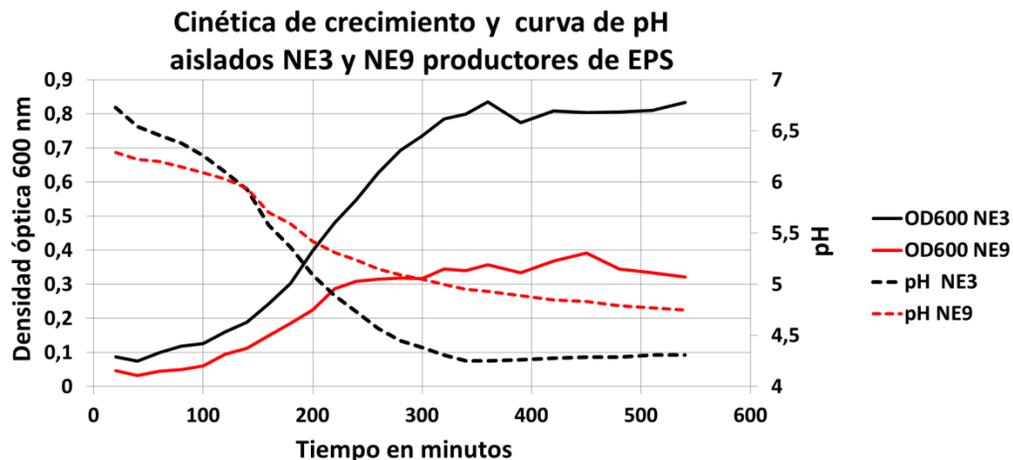


Figura 10. Cinética de crecimiento y análisis de pH de los aislados NE3 y NE9 nativos de una empresa de lácteos y del maíz.

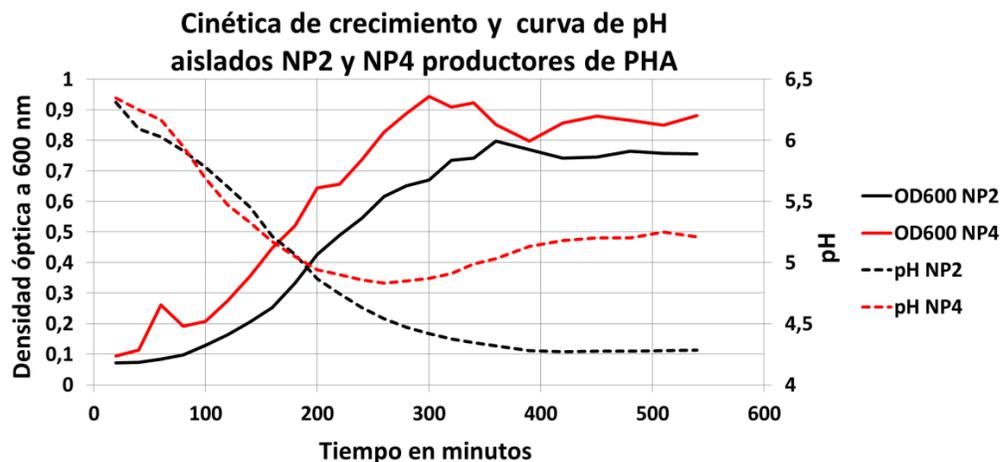


Figura 11. Cinética de crecimiento y análisis de pH de los aislados PHA 124 y 131 nativos inoculados en vertimientos industriales de una empresa de alimentos de los lácteos y del maíz.

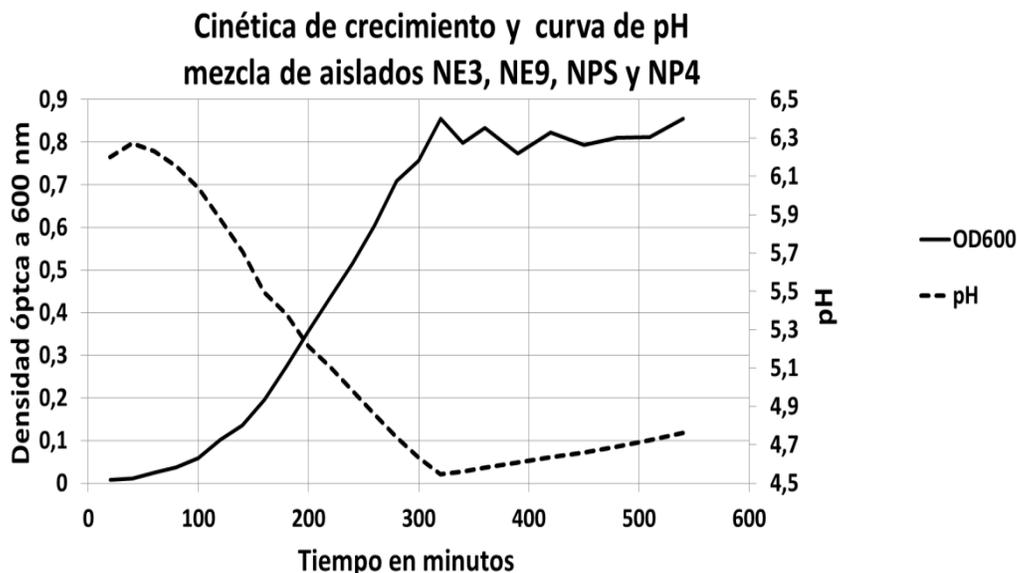


Figura 12. Cinética de crecimiento y análisis de con una mezcla de EPS 124, 131 y PHA 124 y 131 inoculadas en vertimientos industriales de una empresa de alimentos de los lácteos y del maíz.

### 7.2.2 Estudio de cinética de crecimiento de los aislados seleccionados para las empresas de alimentos del sector de la confitería

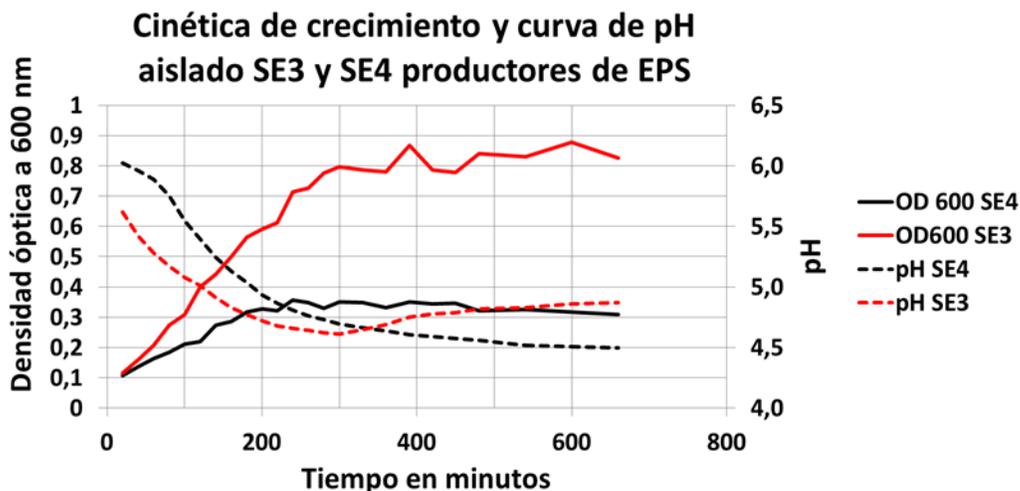


Figura 13. Cinética de crecimiento y análisis de pH con los aislados EPS 86 y 97 inoculados en vertimientos industriales de una empresa de alimentos del sector de la confitería.

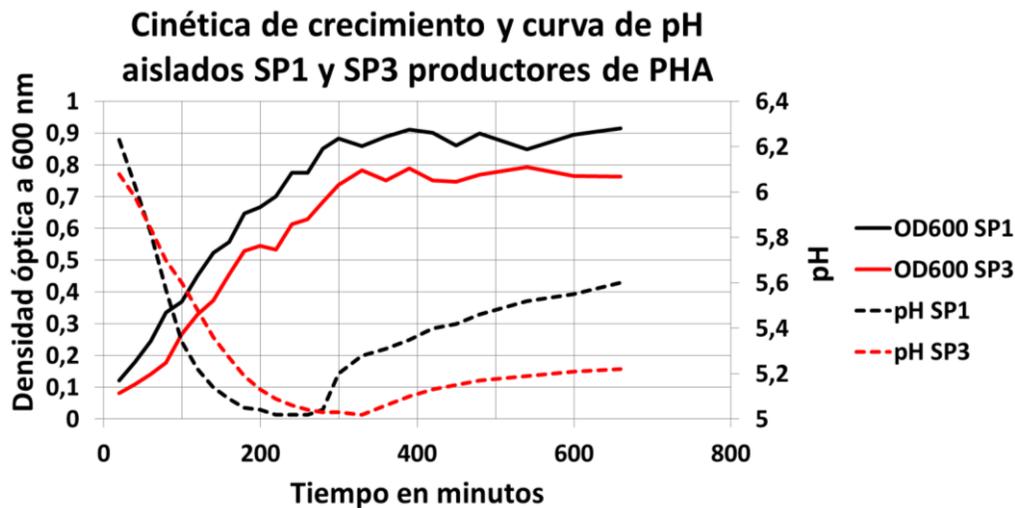


Figura 14. Cinética de crecimiento y análisis de pH con los aislados PHA 101 y 104b inoculados en vertimientos industriales de una empresa de alimentos del sector de la confitería.

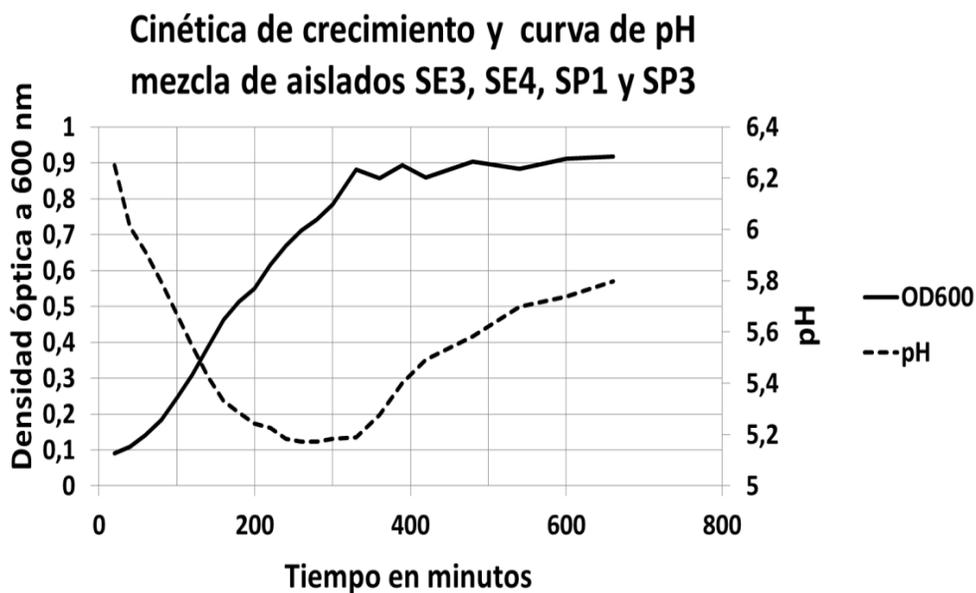


Figura 15. Cinética de crecimiento y análisis de pH con una mezcla de EPS 124, 131 y PHA 124 y 131 inoculados en vertimientos industriales de una empresa de alimentos de los lácteos y del maíz.

En las figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15 se puede observar un comportamiento similar de todos los aislados ya que a medida que la biomasa microbiana aumenta, el pH desciende producto

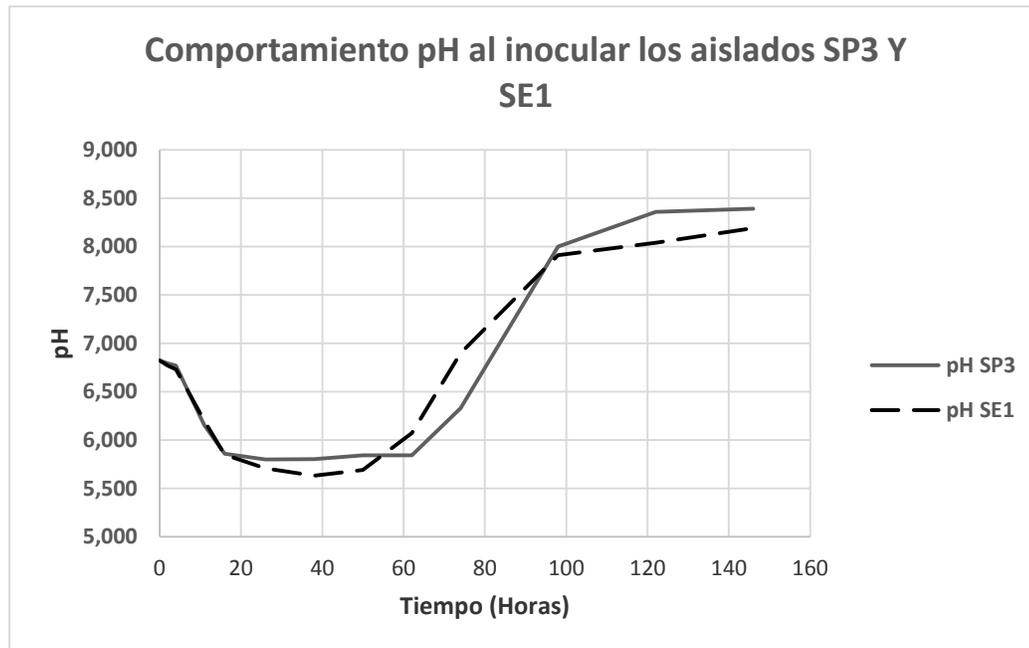
del metabolismo microbiano al degradar los componentes propios del medio; estabilizándose tan pronto la bacteria llega a su fase estacionaria. La tendencia inicial del pH muestra un fuerte descenso hasta alcanzar valores mínimos entre 4,3 y 5,2, en una segunda etapa muestra una tendencia al ascenso hasta encontrar valores de 5,8 como observamos en la figura 15 donde la estabilidad en la densidad óptica esta alrededor de 0,9, similar comportamiento fue reportado por Nyman en el 2010, quien expresa que el descenso en el pH se debe probablemente a la producción de dióxido de carbono.

Tal observación permite definir dos etapas en el comportamiento de los aislados, común a todos ellos, en donde a medida que la densidad óptica sube, el pH baja por la producción de metabolitos de características ácidas como el  $\text{CO}_2$ , una vez la cinética de crecimiento llega a su fase estacionaria, el pH empieza a subir muy lentamente, comportamiento que es asociado probablemente al punto donde los aislados han consumido toda la fuente de carbono presente en el sustrato e inician con la acumulación de material de reserva formando 4-hidroxi-butirato, precursor para la formación de polihidroxi-butirato (PHB), compuesto con características básica. (Valappil, 2007).

Otero en el 2012 reporta que el perfil de crecimiento del aislamiento bacteriano E1M10 RP presenta una fase exponencial durante las primeras 24 h y una fase estacionaria que se extiende desde las 30 h hasta después de las 84 h de cultivo. Estos resultados reportados tienen similares comportamientos a los encontrados en este estudio.

## 7.3 Prueba piloto

### 7.3.1 Comportamiento del pH con la inoculación de las bacterias SP3 y SE1 en vertimientos de una empresa de alimentos del sector de la confitería



**Figura 16. Comportamiento del pH en vertimiento de empresa de alimentos del sector de la confitería autoclavado e inoculado con aislado SP3 productor de PHA y SE1 productor de EPS.**

En la figura 16 se observa que el comportamiento del pH, inicialmente es descendente alcanzando valores mínimos entre 5,6 y 5,8 posiblemente, por la producción probablemente de dióxido de carbono como lo reporta (Nyman, 2010), y a la producción de aceto acetil en el ciclo de krebs de características ácidas según la ruta metabólica reportada por (Rivera & Nevarez, 2009) para la producción de PHA, alcanzando un punto mínimo entre las 15 y 62 horas para el caso del aislado SP3 y de 15 a 50 horas en el caso del aislado SE1 en el cual cambia su tendencia y muestra un ascenso producto de la síntesis del 3 hidroxibutiril según ruta metabólica reportada por (Rivera & Nevarez, 2009) para la producción de PHA, hasta llegar a un punto de cambio en pH relativamente bajo después de las 100 horas en ambos casos.

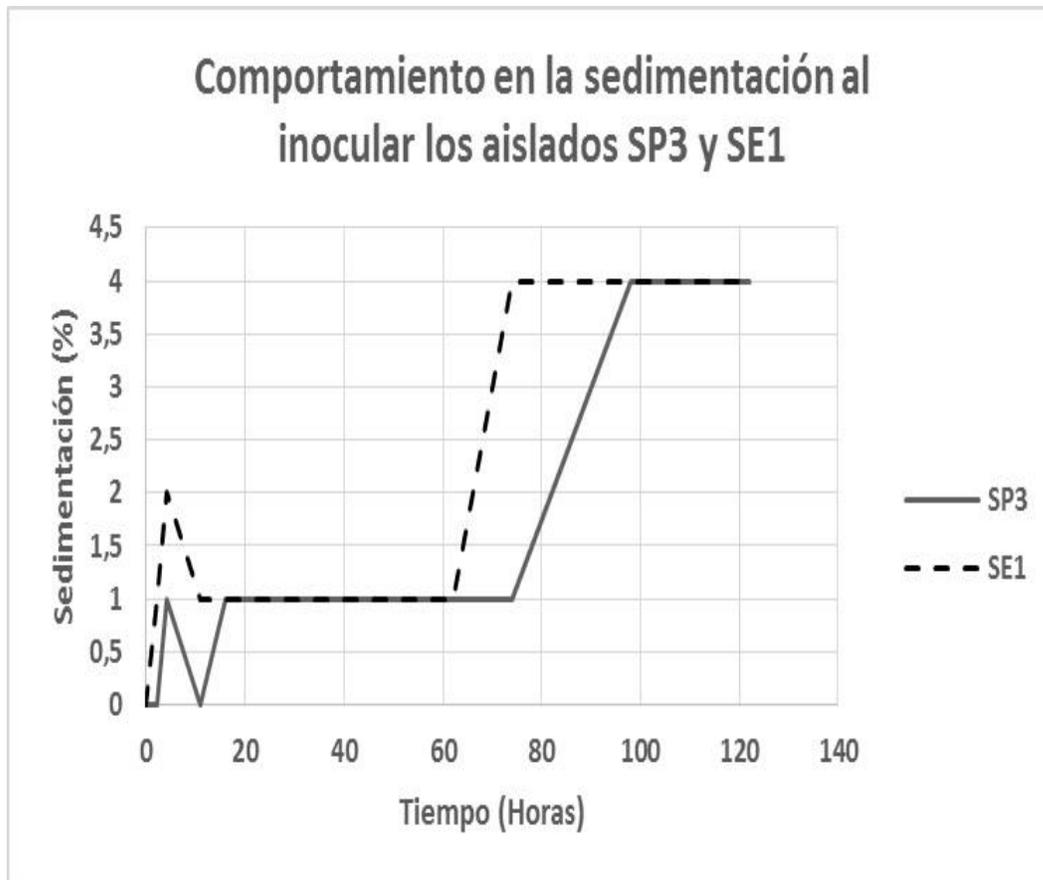


Figura 17. Comportamiento de la sedimentación en vertimiento de empresa de alimentos del sector de la confitería autoclavado e inoculado con aislado SP3 productor de PHA y SE1 productor de EPS.

En la figura 17 se puede observar como el porcentaje de sedimentación mayor se da después de las 98 horas en el caso del aislado SP3 y de las 74 horas en el caso del aislado SE1, comportamiento que se da cuando justamente el pH empieza a estabilizar en la etapa de ascenso como se puede observar en la figura 16., lo que hace presumir que al llegar a la fase estacionaria de la curva de crecimiento bacteriano ocurre la sedimentación por efectos del proceso de floculación.

(Salehizadeh & Shojaosadati, 2001) afirman que existe una correlación entre la acumulación de floculante biopolimérico extracelular y la agregación celular. La floculación biológica se presenta únicamente cuando el microorganismo ha entrado a su fase endógena, es decir cuando cesa el crecimiento y la concentración de alimento es mínima. Estos resultados sugieren que la producción del biopolímero extracelular se presenta en la fase final en un cultivo por lotes (batch). (Shimofuruya *et al.*, 1996) determinaron que la actividad floculante,

para *Streptomyces griceus* incrementó con el tiempo de cultivo luego de los tres días; encontrándose el máximo valor a los 4 días de evaluación. (Hantula & Bamford, 1991), encontraron que la actividad floculante para *Flavobacterium* sp. Se dio al final de la fase de crecimiento exponencial e inicios de la fase estacionaria.

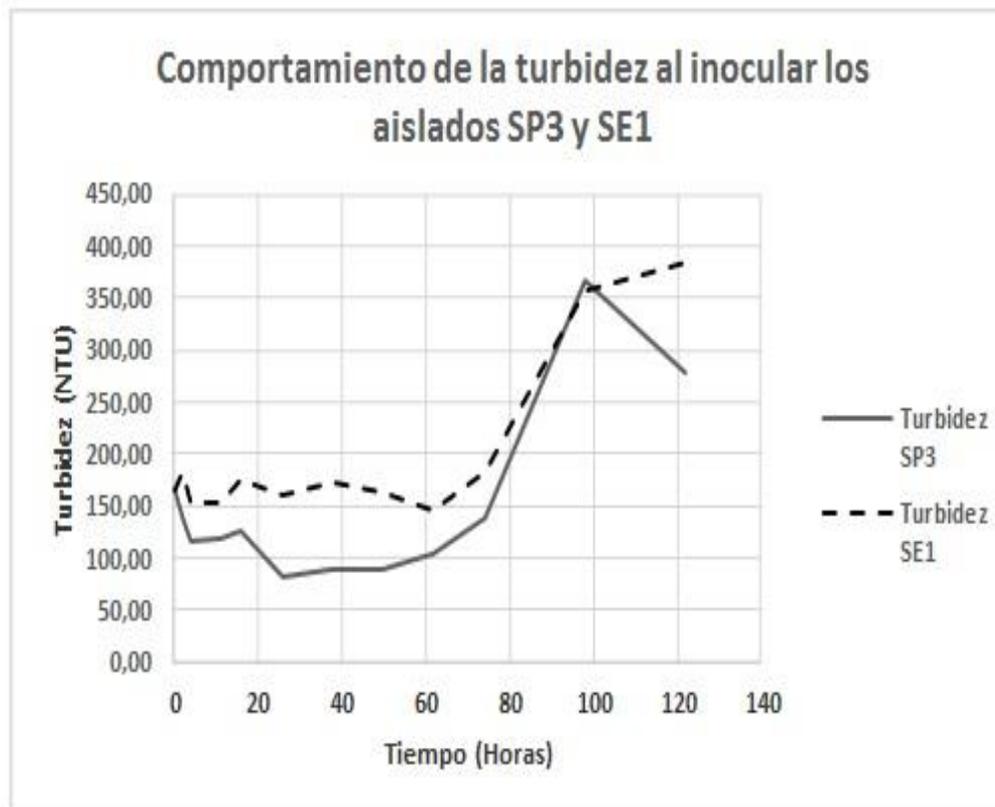


Figura 18. Comportamiento de la turbidez después de sedimentación en vertimiento de empresa de alimentos del sector de la confitería autoclavado e inoculado con aislado SP3 productor de PHA y SE1 productor de EPS.

En la figura 18 el comportamiento de la turbidez del aislado SP3, muestra inicialmente un leve descenso debido a la producción de biomasa generada en el proceso aeróbico durante las primeras 30 horas, punto donde se observó sedimentación, entre las 30 y 70 horas su comportamiento fue estable, después de las 70 horas cambió su tendencia, mostrando un comportamiento ascendente hasta las 120 horas donde se obtiene una sedimentación superior que se encuentra alrededor del 4% según la figura 17, en términos generales la turbidez pasó de 164 a 366 NTU, debido al crecimiento de la población bacteriana y por el

consumo del sustrato, ahora el comportamiento del aislado SE1 productor de EPS fue muy similar, pues tiene una pequeña tendencia al descenso en las primeras 4 horas y una tendencia a la estabilidad alrededor de 160 NTU hasta cumplidas las 60 horas de inoculado este aislado, donde inicia un aumento en esta variable, la cual trata de estabilizar después de las 100 horas de trabajo, este comportamiento llevó a aumentar la turbidez de 164 a 384 NTU.

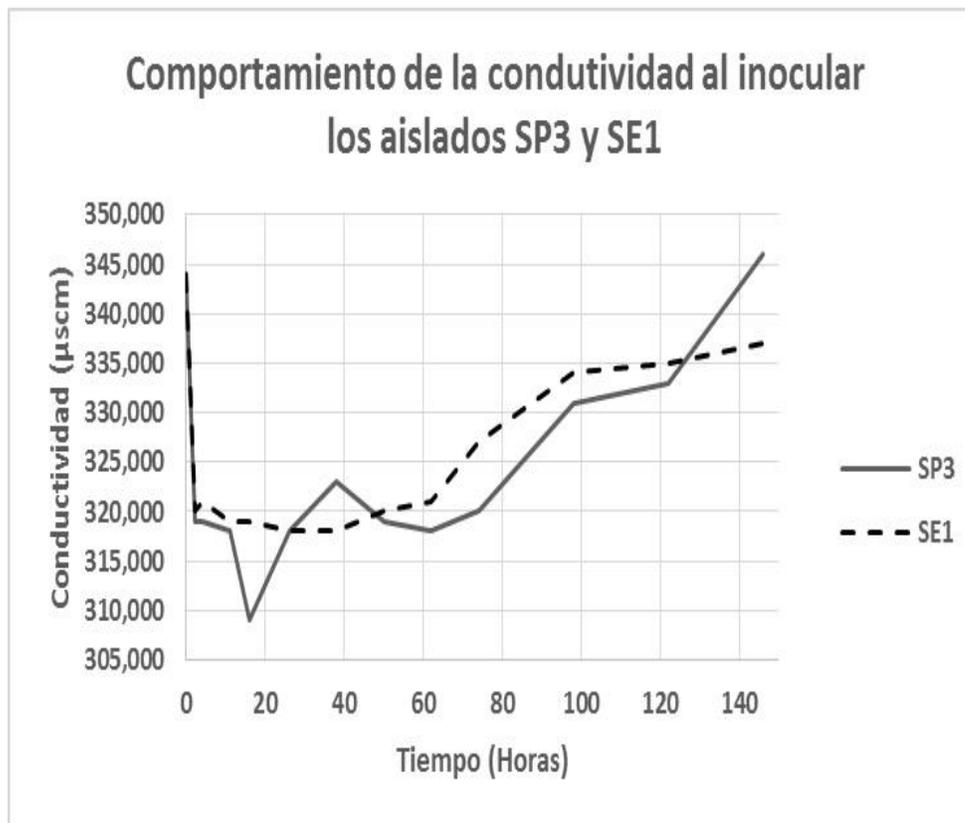


Figura 19. Comportamiento de la conductividad en vertimiento de empresa de alimentos del sector de la confitería autoclavado e inoculado con aislado SP3 productor de PHA y SE1 productor de EPS.

En la figura 19 el comportamiento de la conductividad inicialmente reduce su valor debido a la formación a la acumulación de sedimentos inicialmente, precipitando los sólidos suspendidos, llegando a un punto mínimo a las 16 horas para el aislado SP3 y a las 28 horas para el aislado SE1, donde se inicia un ascenso en el valor de la conductividad que está asociada a la “medida indirecta de sólidos disueltos” (Sierra, 2011) y este comportamiento

posiblemente se debe al proceso metabólico generado por las bacterias inoculadas al aumentar el tamaño de su biomasa.

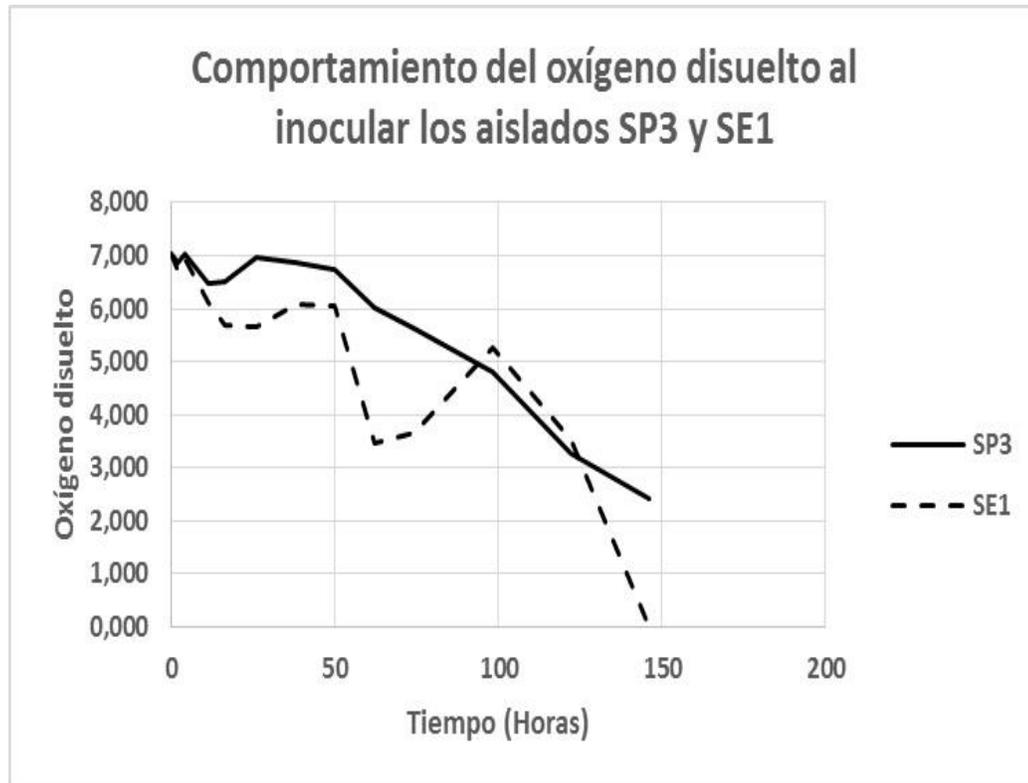


Figura 20. Comportamiento del oxígeno disuelto después de sedimentación en vertimiento de empresa de alimentos del sector de la confitería autoclavado e inoculado con aislado SP3 productor de PHA.

El oxígeno disuelto es una variable muy sensible a la presencia de sólidos suspendidos y disueltos, en la figura 7-15 se observa una caída pronunciada de la concentración de oxígeno disuelto en el sustrato, esto es como consecuencia del aumento de biomasa en suspensión por la actividad de los aislados y su crecimiento de población. En esta parte es importante resaltar que “valores de oxígeno disuelto muy inferiores a la saturación son indicadores de la presencia de materia orgánica” (Von Sperling, 2005) lo que posiblemente este asociado al aumento de turbidez producto del crecimiento de la población bacteriana como se ha dicho anteriormente.

Es importante resaltar que las curvas de pH, el porcentaje de sedimentación, la turbidez y la conductividad presentan similares comportamientos y en el caso del oxígeno disuelto

muestra un descenso severo a medida que transcurre el tiempo de reacción hasta llegar a condiciones de anaerobiosis.

## 7.4 Evaluación de la remoción en niveles de Sólidos Suspendidos totales (S.S.T), Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Demanda Bioquímica de Oxígeno en cinco días (DBO5), a escala de laboratorio



Figura 21. Comportamiento del pH en afluente de una empresa de alimentos lácteos y del maíz al inocular el aislado NP2.

### Comportamiento del pH en afluente de una empresa de alimentos del sector de la confitería - SE4

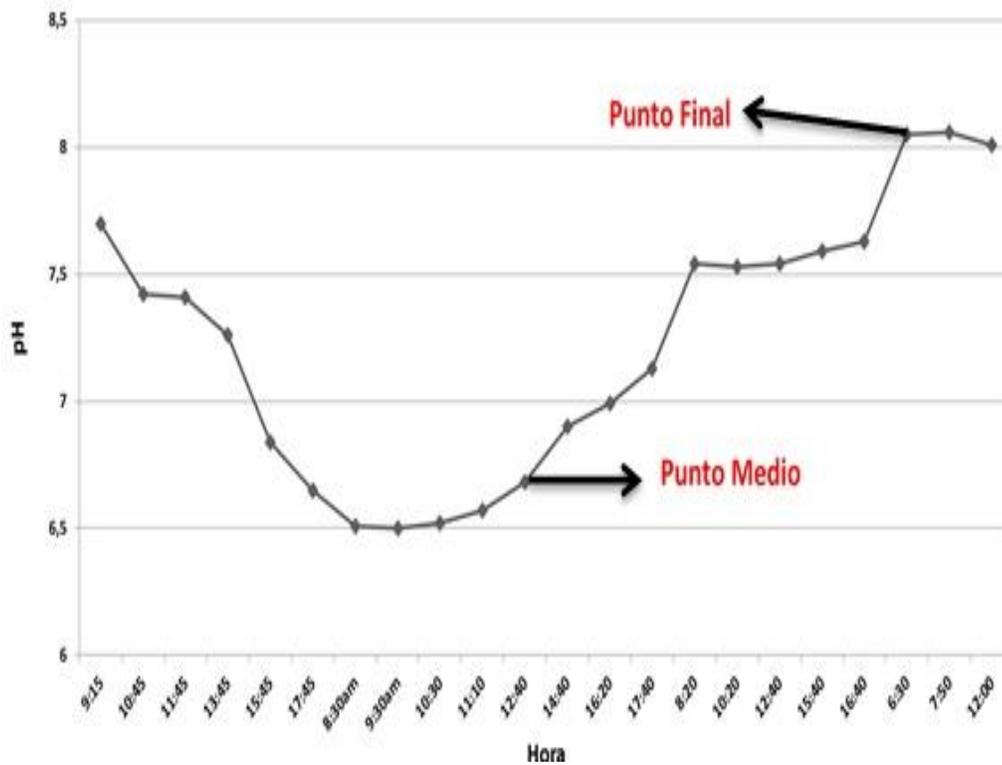


Figura 22. Comportamiento del pH en afluente de una empresa de alimentos del sector de la confitería al inocular el aislado SP4

En las figuras 21 y 22 se observa el comportamiento típico de los pH en los aislados NP2 y SE4 utilizados para esta investigación. Esto permitió establecer los puntos de muestreo; como punto medio, donde están los valores mínimos de pH, y punto final, se observa tendencia a la estabilización del pH incremento en los valores, y la gráfica presentó una tendencia a la estabilización en el pH como se observó en la prueba piloto en la figura 16.

### 7.4.1 Caracterización fisicoquímica

Tabla 5. Caracterización fisicoquímica de los vertimientos antes de ser tratados, de una empresa de alimentos lácteos y del maíz

<b>Caracterización fisicoquímica de afluente Empresa del sector de los lácteos y del maíz</b>			
<b>Parámetro</b>	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>
pH	5,80	6,32	6,78
Temperatura (°C)	21,67	23,19	23,94
Conductividad (µs/cm)	596,56	624,89	559,88
Oxígeno disuelto (mg/L)	6,59	5,69	6,34
Caudal (L/s)	2,12	0,85	0,50
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	5391	5226	3246
DQO (mg/L)	7850	7289	4860
DQO/DBO <sub>5</sub>	1,46	1,39	1,50
S.S.T.	245	2150	450
Nitrógeno orgánico (mg/L)	18,2	29	4,49
Ortofosfatos (mg/L)	30	60	50
Carbono Orgánico Total (mg/L)	930	1730	1980

Tabla 6. Caracterización fisicoquímica de los vertimientos antes de ser tratados, de una empresa de alimentos del sector de la confitería.

<b>Caracterización fisicoquímica de afluente Empresa de alimentos del sector de la confitería</b>			
<b>Parámetro</b>	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>
pH	7,211	5,577	6,441
Temperatura (°C)	34,225	29,913	32,875
Conductividad (µs/cm)	526,500	712,500	641,750
Oxígeno disuelto (mg/L)	2,069	2,014	2,050
Caudal (L/s)	1,371	1,007	1,138
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	7842	9570	8712
DQO (mg/L)	9768	11526	10345
DQO/DBO	1,25	1,20	1,19
S.S.T.	1400	1200	1700
Nitrógeno orgánico (mg/L)	825	732	337
Ortofosfatos (mg/L)	50	40	20
Carbono Orgánico Total (mg/L)	920	1250	730

En la tabla 5 y 6 se encuentra la caracterización fisicoquímica en tres momentos diferentes (Muestra 1, 2 y 3), donde se aprecian que la relación de DQO/DBO<sub>5</sub> presenta valores que

permiten definir los vertimientos como altamente biodegradables según la guía ambiental formulación de planes de pretratamiento de efluentes industriales de 2002. Esta relación debe ser menor a 3 para considerar los vertimientos como degradables biológicamente, y el hecho de ser empresa del sector de alimentos, favorece encontrar residuos con tasa de carbono orgánico considerables, adicional a esto es importante contar en estos vertimientos con unos contenidos de fósforo, los cuales fueron medidos en forma de ortofosfatos porque “están directamente disponibles para el metabolismo biológico sin necesidad de conversiones a formas más simples” (Von Sperling, 2005) y nitrógeno que favorecen el metabolismo de las bacterias a inocular, aunque es importante recordar que el tipo de aislados objeto de estudio requieren bajos contenido de nitrógeno para obtener mejores rendimientos.

## 7.4.2 Remoción de sólidos suspendidos totales

Tabla 7. Remoción de S.S.T en empresa de alimentos lácteos y del maíz

<b>Porcentaje de remoción de S.S.T. Empresa de alimentos lácteos y del maíz</b>						
<b>Aislado</b>	<b>Muestra 1</b>		<b>Muestra 2</b>		<b>Muestra 3</b>	
	<b>Punto medio</b>	<b>Punto final</b>	<b>Punto medio</b>	<b>Punto final</b>	<b>Punto medio</b>	<b>Punto final</b>
<b>NP2</b>	28,57	75,51	81,40	87,44	55,56	88,89
<b>NP4</b>	20,41	61,22	60,47	82,09	22,22	88,89
<b>NP2, NP4</b>	20,41	24,49	79,07	80,70	55,56	77,78
<b>NE3</b>	12,24	18,37	83,72	76,28	55,56	94,44
<b>NE9</b>	28,57	34,69	79,07	86,98	55,56	88,89
<b>NE3, NE9</b>	44,90	79,59	86,05	97,67	55,56	77,78
<b>NP2, NP4, NE3, NE9</b>	36,73	91,84	83,72	99,07	44,44	94,44
<b>Control</b>	16,33	65,31	88,37	96,05	33,33	33,33

Muestra control: muestra cruda sin adición de ninguno de los aislados en de estudio.

En la tabla 7 se registraron los resultados obtenidos con respecto a remoción de sólidos suspendidos totales. Se puede observar que las remociones en los puntos de estabilización de la curva de pH, o sea en el punto final fueron mayores que en el punto medio como se observó en la prueba piloto, en donde los aislados con mayor remoción fueron NE3, el

consorcio NE3-NE9 y el consorcio NP2-NP4-NE3-NE9, es importante resaltar que a pesar que la muestra control no fue la de mayor remoción en los tres muestreos, sus resultados fueron satisfactorios en la muestra 2.

Tabla 8. Porcentaje de remoción de S.S.T. de una empresa de alimentos del sector de la confitería.

<b>Porcentaje de remoción de S.S.T. Empresa de alimentos del sector de la confitería</b>						
<b>Aislado</b>	<b>Muestra 1</b>		<b>Muestra 2</b>		<b>Muestra 3</b>	
	<b>Punto medio</b>	<b>Punto final</b>	<b>Punto medio</b>	<b>Punto final</b>	<b>Punto medio</b>	<b>Punto final</b>
<b>SP1</b>	39,29	35,71	16,67	37,50	14,71	23,53
<b>SP3</b>	35,71	39,29	25,00	33,33	11,76	14,71
<b>SP1,SP3</b>	35,71	42,86	20,83	33,33	20,59	38,24
<b>SE3</b>	35,71	46,43	12,50	25,00	20,59	41,18
<b>SE4</b>	32,14	46,43	25,00	29,17	26,47	55,88
<b>SE3,SE4</b>	39,29	35,71	20,83	25,00	17,65	32,35
<b>SP1,SP3,SE3,SE4</b>	25,00	28,57	4,17	8,33	8,82	17,65
<b>Control</b>	50,00	60,71	25,00	54,17	35,29	61,76

Los porcentajes de remoción registrados en la tabla 8 muestran que los aislados seleccionados tienen una tasa de remoción de sólidos suspendidos totales muy inferior a la tasa de remoción que tiene la muestra control analizada, con lo que se puede predecir que en el caso de esta empresa, el uso de este tipo de aislado no favorece una efectiva tasa de remoción en cuanto a sólidos suspendidos. Es importante aclarar que el control, es una muestra a la cual solamente se le inyectó aire de forma ascendente y que ninguna de las muestras tiene un pretratamiento previo. Es importante mencionar que el aislado SE4 presenta un porcentaje de remoción del 55,88% superior a los demás aislados en estudio, pero inferior a la muestra control que presentó una remoción del 61,76%.

### 7.4.3 Remoción de demanda bioquímica de oxígeno

Tabla 9. Remoción de DBO<sub>5</sub> en empresa de alimentos lácteos y del maíz

<b>Porcentaje de remoción de DBO<sub>5</sub> Empresa de alimentos lácteos y del maíz</b>			
<b>Aislado</b>	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>
<b>NP2</b>	46,30	90,87	55,73
<b>NP4</b>	9,57	91,22	41,40
<b>NP2,NP4</b>	4,40	93,97	26,89
<b>NE3</b>	3,73	18,48	24,68
<b>NE9</b>	30,72	87,03	35,21
<b>NE3,NE9</b>	2,39	15,27	14,60
<b>NP2,NP4,NE3,NE9</b>	97,50	98,68	99,17
<b>Control</b>	43,35	93,69	53,97

En la tabla 9 la remoción del DBO<sub>5</sub> muestra que el consorcio NP2-NP4-NA3-NE9 tiene un resultado alto en remoción con respecto a los demás aislados teniendo valores entre el 97,5% y el 99,17%, también es importante resaltar que en la muestra 2 se obtienen resultados de remoción muy favorables en los aislados NP2, NP4, NE9, en el consorcio NP2-NP4, en el consorcio NP2-NP4-NE3-NE9 y adicionalmente la muestra control, que no tiene ningún inóculo, presenta una tasa de remoción del 93,69% como resultado de su autodepuración.

Tabla 10. Porcentaje de remoción de DBO<sub>5</sub> de una empresa de alimentos del sector de la confitería

<b>Porcentaje de Remoción de DBO<sub>5</sub></b> <b>Empresa de alimentos del sector de la confitería</b>			
<b>Aislado</b>	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>
<b>SP1</b>	56,01	59,12	58,65
<b>SP3</b>	58,00	58,01	56,57
<b>SP1,SP3</b>	62,02	68,00	64,14
<b>SE3</b>	65,01	61,00	62,12
<b>SE4</b>	58,02	52,02	57,78
<b>SE3,SE4</b>	68,02	66,02	70,48
<b>SP1,SP3,SE3,SE4</b>	62,02	65,08	64,44
<b>Control</b>	82,02	78,01	79,94

En los resultados de la tabla 10 se observa la tendencia a la autodepuración de la DBO<sub>5</sub> del afluente, ya que el control presenta valores que oscilan entre 78,01% y 82,02%, superiores a las demás muestras. El consorcio SE3-SE4 muestra unos resultados aceptables que están entre el 66,02% y el 70,48% puesto que no se realiza ningún tipo de pretratamiento.

Los resultados obtenidos son comparables con los obtenidos por Patil *et al* en 2011 en estudio quien con *Azotobacter indicus*, encontrando que el tratamiento de agua residual con biopolímeros presenta una reducción en DBO entre el 38 y 80%; llegando a la conclusión que el polímero producido por esta bacteria tiene una alta potencialidad en el tratamiento de este tipo de aguas, de igual manera Li en el 2006 encontró valores de remoción del 55,4% y 62,3% en aislados de *Agrobacterium radiobacter*,

#### 7.4.4 Remoción de demanda química de oxígeno

Tabla 11. Porcentaje De remoción de DQO en empresa de alimentos lácteos y del maíz

<b>Porcentaje de remoción de DQO Empresa de alimentos lácteos y del maíz</b>			
<b>Aislado</b>	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>
NP2	67,24	64,01	83,95
NP4	61,95	64,47	78,60
NP2, NP4	34,06	46,14	71,40
NE3	64,51	71,33	65,99
NE9	39,03	46,55	69,59
NE3, NE9	44,74	63,78	80,43
NP2, NP4, NE3, NE9	68,24	70,24	85,93
Control	81,12	77,77	67,08

La remoción de DQO muestra en la tabla 11 que el aislado NP2 muestra tendencia a obtener la mejor tasa de remoción con valores comprendidos entre 67,24% y 83,95%, junto con el consorcio NP2-NP4-NE3-NE9 con una tasa de remoción que va desde 68,24% hasta un 85,95%. El control muestra una tasa de remoción importante entre 67,08% hasta el 81,12% como producto de su autodepuración natural.

Tabla 12. Porcentaje De remoción de DQO de una empresa de alimentos del sector de la confitería

<b>Porcentaje de Remoción de DQO</b>			
<b>Empresa de alimentos del sector de la confitería</b>			
<b>Aislado</b>	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>
<b>SP1</b>	12,54	15,42	7,01
<b>SP3</b>	51,46	55,80	52,25
<b>SP1,SP3</b>	44,80	56,53	54,08
<b>SE3</b>	68,38	66,58	78,93
<b>SE4</b>	71,88	73,79	69,55
<b>SE3,SE4</b>	69,17	71,16	79,51
<b>SP1,SP3,SE3,SE4</b>	67,23	70,71	72,26
<b>Control</b>	54,60	49,05	52,44

En la tabla 12, la DQO registrada muestra unas condiciones de remoción considerables en los aislados SE3, SE4, en el consorcio SE3-SE4, en el consorcio SP1-SP3-SE3-SE4, en este caso la muestra control registra datos inferiores a los anteriores, los cuales oscilan entre el 49,05% y el 54,6% de remoción.

De acuerdo a estudios realizados por Otero en 2012, obtuvo remociones que oscilaron entre el 60,26% y el 94,63 % haciendo uso de bacterias productoras de PHA utilizando como sustrato aguas residuales domésticas de la ciudad de Pasto, lo cual permite tener un comparativo en cuanto a lo reportado en esta investigación, pues también se obtuvieron resultados entre estos rangos.

### 7.4.5 Comparativo entre remociones con respecto a los aislados seleccionados

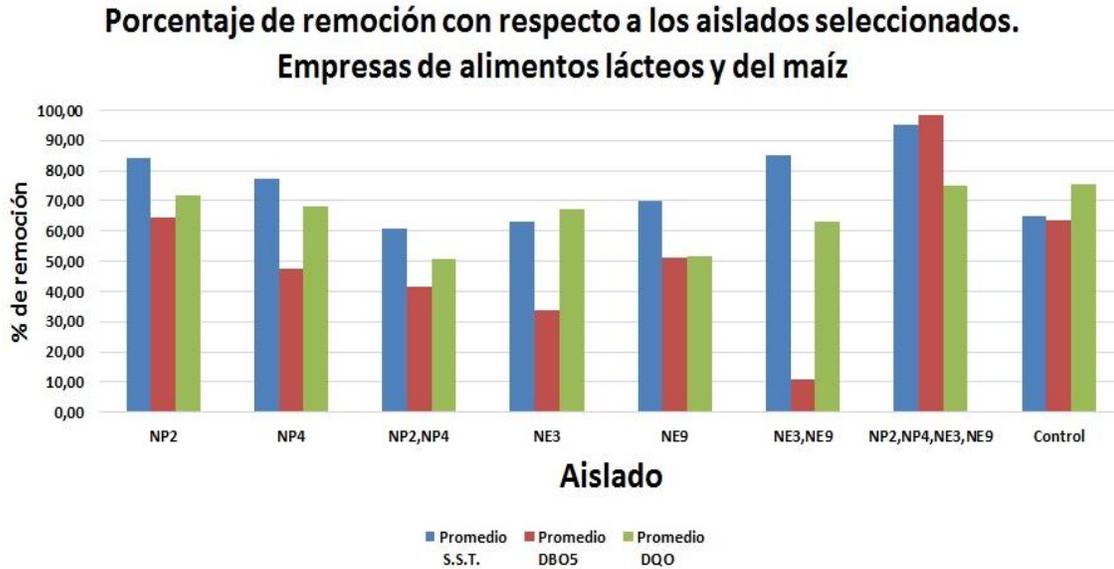


Figura 23. Porcentaje de remoción con respecto a los aislados seleccionados de la empresa de alimentos del sector lácteo y del maíz

Muestra control: muestra cruda sin adición de ninguno de los aislados en estudio.

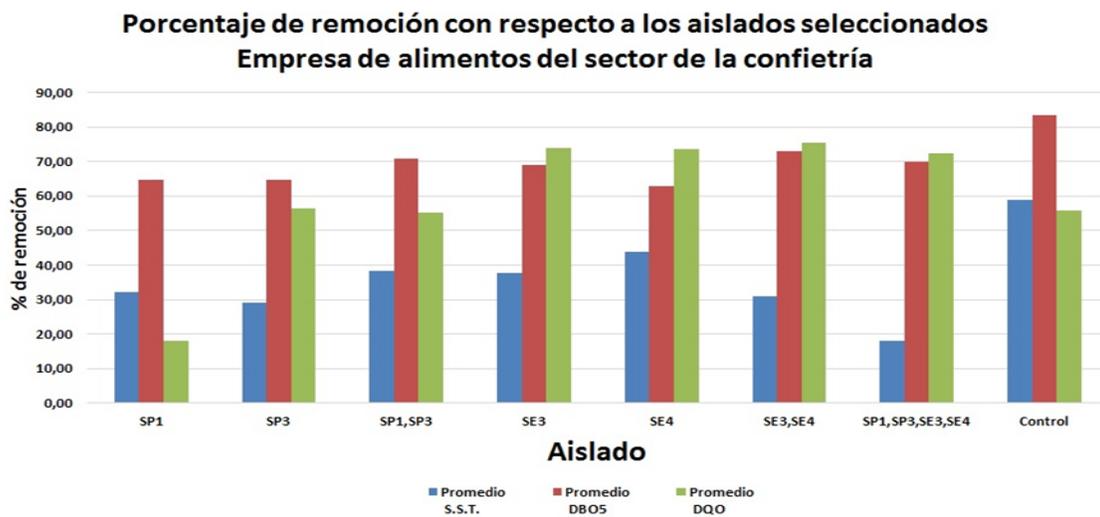


Figura 24. Porcentaje de remoción con respecto a los aislados seleccionados en una empresa de alimentos del sector de la confitería

En las figuras 23 y 24 el control corresponde a una muestra igual que las demás, con su inyección de aire, pero a la cual no se le adicionó ninguna bacteria, la cual cuenta con microorganismos nativos del afluente.

En las tablas 7, 8, 9, 10, 11, 12 se registraron los datos obtenidos para cada uno de los estudio de remoción realizados, con las figuras 22 y 23 se pretende realizar una descripción de los resultados en conjunto.

En la figura 23 se puede observar que los mejores resultados de remoción fueron obtenidos por el consorcio NP2-NP4-NE3-NE9 en cuanto a S.S.T. y DBO<sub>5</sub> superando el 90%, el aislado NP2 y el consorcio NE3-NE9 muestran valores superiores al 80% en S.S.T como lo exige el decreto 1594 de 1984, es importante resalta que en la remoción de DQO los valores mínimos obtenidos fueron superiores al 50% que puede considerarse un valor aceptable teniendo en cuenta que al afluente solo se le ajustó el pH a un valor entre 6 a 8 cuando se requería.

En la figura 24 se puede observar que los niveles de remoción S.S.T. son relativamente bajos con respecto al 80% establecido para descargas en cuerpos de agua del que habla el decreto 1594 de 1984, pero es importante tener en cuenta que según estos resultados que el mejor promedio lo presentó la muestra cruda alcanzando un valor del 58,88%, de lo que puede concluirse que la adición de aislados productores de PHA y EPS no favorecen la remoción de S.S.T. En cuanto a la DBO<sub>5</sub>, se presentaron mejores resultados, siendo el de mayor remoción el ensayo con afluente crudo, alcanzando un valor del 83,33%, superando el 80% establecido en el decreto 1594 de 1984, en DQO aunque en la actualidad no hay una normatividad vigente en cuanto a niveles de remoción el valor obtenido por la muestra control de 55,80% solo supera al aislado SP1 y al consorcio SP1-SP3. Los aislados SE3, SE4 productores de EPS tienen una remoción que supera el 70%, mejorando el comportamiento presentado por los productores de PHA. Por último se puede decir que en cuanto a la normatividad vigente, la inoculación de estos aislados no favorece la remoción de S.S.T y DBO<sub>5</sub>, al mostrar mejores resultados la muestra cruda con su población bacteriana natural.

## **7.5 Determinación de la relación entre los niveles de remoción de los aislados seleccionados y la producción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos**

En este punto es importante tener en cuenta que la tendencia actual para la producción de bioplásticos se inclina a la utilización de fuentes de carbono económicas, las cuales están presentes en grandes cantidades, como desechos agroindustriales, y son carentes de valor

agregado actual, lo que reduce los costos asociados a su producción (Rivera & Nevarez, 2009).

### 7.5.1 Producción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos

Tabla 13. Producción de PHA en afluentes de una empresa de alimentos del sector lácteo y del maíz

<b>Producción de polihidroxicanoatos (mg/L)</b>			
<b>Empresa de productos lácteos y del maíz</b>			
<b>Aislado</b>	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>
<b>NP2</b>	42	33	<b>333</b>
<b>NP4</b>	17	33	<b>1667</b>
<b>NP2, NP4</b>	17	33	0
<b>NP2, NP4, NE3, NE9</b>	100	67	<b>667</b>
<b>Control PHA</b>	0	0	0

Tabla 14. Producción de PHA en una empresa de alimentos del sector de la confitería

<b>Producción de polihidroxicanoatos (mg/L)</b>			
<b>Empresa de alimentos del sector de la confitería</b>			
<b>Aislado</b>	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>
<b>SP1</b>	<b>50</b>	<b>67</b>	<b>87</b>
<b>SP3</b>	<b>180</b>	<b>350</b>	<b>233</b>
<b>SP1, SP3</b>	<b>33</b>	<b>75</b>	<b>92</b>
<b>SP1, SP3, SE3, SE4</b>	<b>33</b>	<b>17</b>	<b>17</b>
<b>CONTROL PHA</b>	<b>0</b>	<b>33</b>	<b>0</b>

En la tabla 13, evidencia la producción de PHA producido por los aislados objeto de estudio en cada una de las muestras tomadas, observándose una producción alta en la muestra tres, en tres de los 5 reactores estudiados, en la tabla 14 se observa una tendencia del aislado SP3 a tener mayor producción con respecto a los demás ensayos que va desde 180 mg/L hasta 350 mg/L. De acuerdo a los resultados obtenidos de los cuatro aislados es importante tener en cuenta que estos son nativos de cada empresa y que los resultados pueden ser solo comparables de acuerdo al sustrato de donde fueron tomados, aunque se podrían realizar estudios posteriores donde se utilicen estos en sustratos diferentes, para conocer su

capacidad de producción. En estudios efectuados por Banacore en 2012 utilizando como sustrato glicerol reportó un máximo valor del 5% en producción de PHA, Cardona y Agudelo en 2012 encontraron producciones de 0,997 g/L y 3,43 g/L de PHA utilizando jarabe glucosado a partir de banano de rechazo y Otero en 2012 reportó producciones de PHA desde 9 g/L hasta 111 g/L en aguas residuales de domésticas en la ciudad de Pasto.

Tabla 15. Producción de EPS en los afluentes de una empresa de productos lácteos y del maíz

<b><u>Producción de exopolisacáridos (mg/L)</u></b> <b><u>Empresa de productos lácteos y del maíz</u></b>			
<b><u>Aislado</u></b>	<b><u>Muestreo 1</u></b>	<b><u>Muestreo 2</u></b>	<b><u>Muestreo 3</u></b>
<b><u>NE3</u></b>	<b><u>8</u></b>	<b><u>0</u></b>	<b><u>667</u></b>
<b><u>NE9</u></b>	<b><u>8</u></b>	<b><u>50</u></b>	<b><u>2333</u></b>
<b><u>NE3,NE9</u></b>	<b><u>8</u></b>	<b><u>17</u></b>	<b><u>1667</u></b>
<b><u>NP2,NP4,NE3,NE9</u></b>	<b><u>17</u></b>	<b><u>0</u></b>	<b><u>333</u></b>
<b><u>Control EPS</u></b>	<b><u>0</u></b>	<b><u>0</u></b>	<b><u>0</u></b>

Tabla 16. Producción de EPS de una empresa de alimentos del sector de la confitería

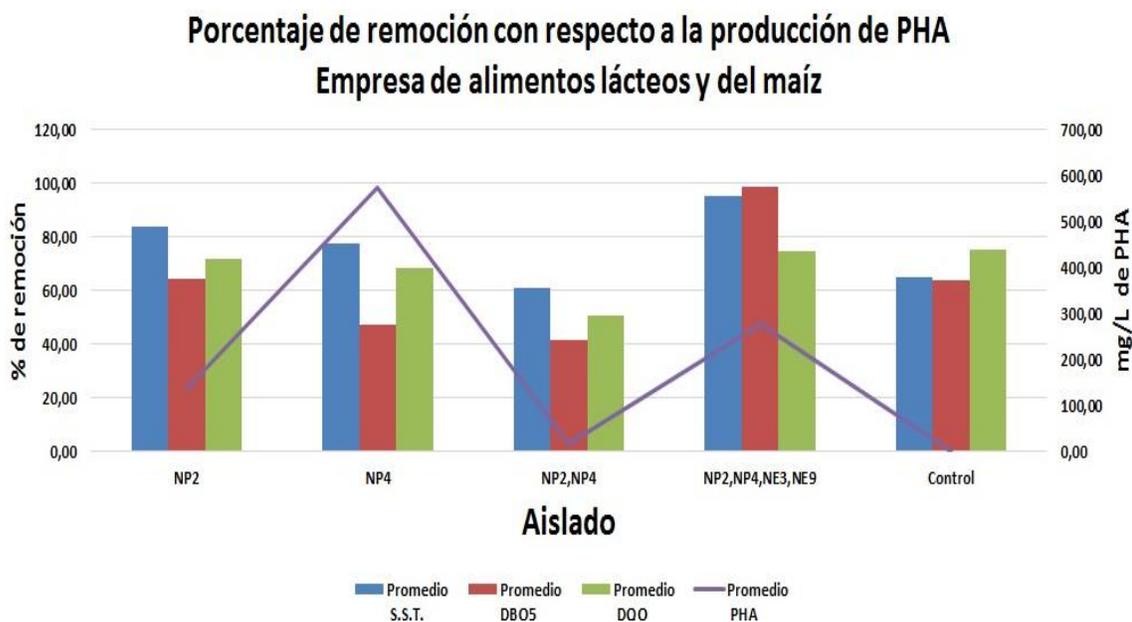
<b><u>Producción de exopolisacáridos (mg/L)</u></b> <b><u>Empresa de alimentos del sector de la confitería</u></b>			
<b><u>Aislado</u></b>	<b><u>Muestra 1</u></b>	<b><u>Muestra 2</u></b>	<b><u>Muestra 3</u></b>
<b><u>SE3</u></b>	<b><u>792</u></b>	<b><u>1.400</u></b>	<b><u>42</u></b>
<b><u>SE4</u></b>	<b><u>2.950</u></b>	<b><u>6.458</u></b>	<b><u>10.042</u></b>
<b><u>SE3,SE4</u></b>	<b><u>50</u></b>	<b><u>67</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>SP1,SP3,SE3,SE4</u></b>	<b><u>1.575</u></b>	<b><u>1.992</u></b>	<b><u>1.958</u></b>
<b><u>CONTROL EPS</u></b>	<b><u>0</u></b>	<b><u>0</u></b>	<b><u>75</u></b>

En la tabla 15, se observa una producción alta en la muestra tres, debido posiblemente a unas características particulares del afluente, no detectadas en este estudio. En la tabla 16, la producción del aislado SE4 muestra una alta producción con respecto a los demás aislados alcanzando una cifra de 10.042 mg/L, seguida del consorcio SP1-SP3-SE3-SE4.

En estudio realizado con el hongo *Grifola frondosa* y haciendo análisis en diferentes fuentes de carbono, se encontró que la máxima producción de EPS fue de  $6,53 \pm 0,14$  g/l (Zapata et

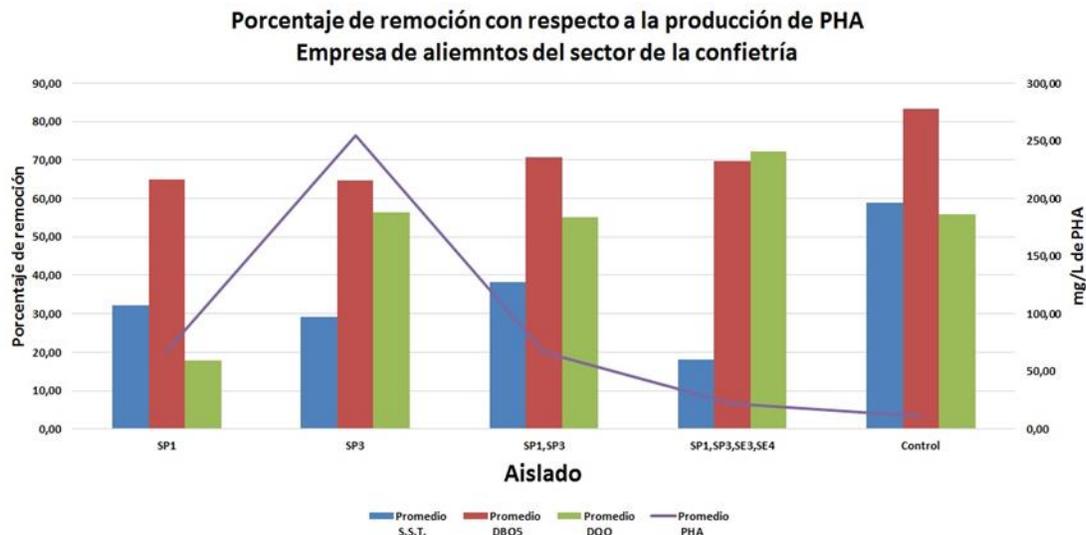
*al.*, 2007) y en la producción de exopolisacáridos a partir de lactosuero se consiguieron producciones hasta de 4,47 g/l. (Paris, 2009), esta información nos permite establecer la importancia que tiene este sustrato industrial en la producción de exopolisacáridos haciendo uso del aislado SE4

## 7.5.2 Porcentaje de remoción con respecto a la producción de PHA y EPS.



**Figura 25. Porcentaje de remoción con respecto a la producción de PHA en una empresa de alimentos lácteos y del maíz.**

Según la figura 25, la producción de PHA en el aislado NP4 sobresale de manera importante sobre los demás aislados, pues alcanzó la producción más alta con respecto a los demás, siendo esta de 572,22 mg/L, para unos niveles de remoción del 77,4% para S.S.T., del 47,40 % para la DBO<sub>5</sub> de un 68,34% para la DQO. En cuanto al consorcio NP2-NP4-NE3-NE9 que reporta importantes tasas de remoción se observa que la producción es de alrededor de un 48,5% con respecto a la del aislado NP4, alcanzando un valor de 277,78 mg/L. La muestra control (sin adición de aislados) no presentó producción.



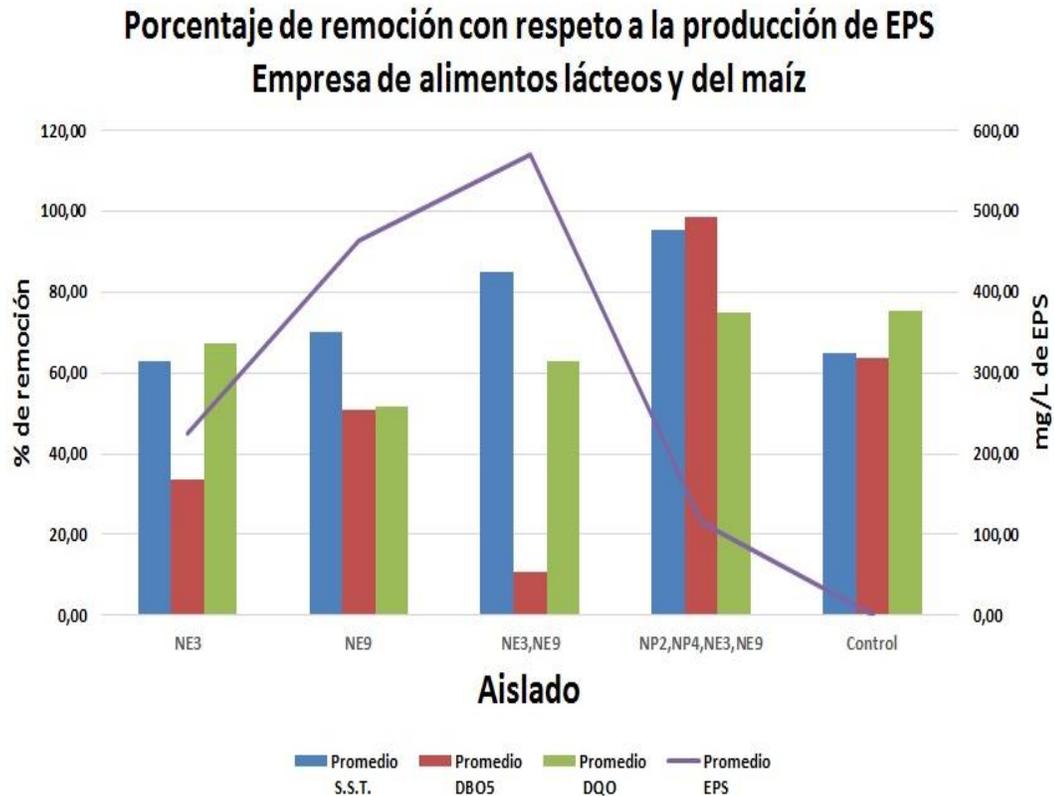
**Figura 26. Porcentaje de remoción con respecto a la producción de PHA en una empresa de alimentos del sector de la confitería**

En la figura 26 se tiene que el aislado SP3 muestra una producción de 254,44 mg/L, con unos niveles de remoción de 29,11% para los S.S.T., 64,76% para la DBO<sub>5</sub> y 56,45% para la DQO, es importante anotar que los niveles de remoción en S.S.T. y DBO<sub>5</sub> fueron superiores en la muestra control, pero presentó una producción de PHA de 11,11 mg/L, que corresponde al 4,37 % con respecto a lo producido por el aislado SP3.

Es importante resaltar las características que tienen las empresas seleccionadas para el estudio, pues todas ellas tienen en común, la presencia de desechos carbonados que sirven como fuente de nutrientes para el metabolismo de las bacterias, de tal forma que puedan hacer la biotransformación necesaria para la depuración de las aguas residuales, pero cada empresa tiene diferencias en las características de sus afluentes lo que hace que cada uno de los resultados sea independiente, adicional a esto se trabajó con aislados nativos de cada una de ellas.

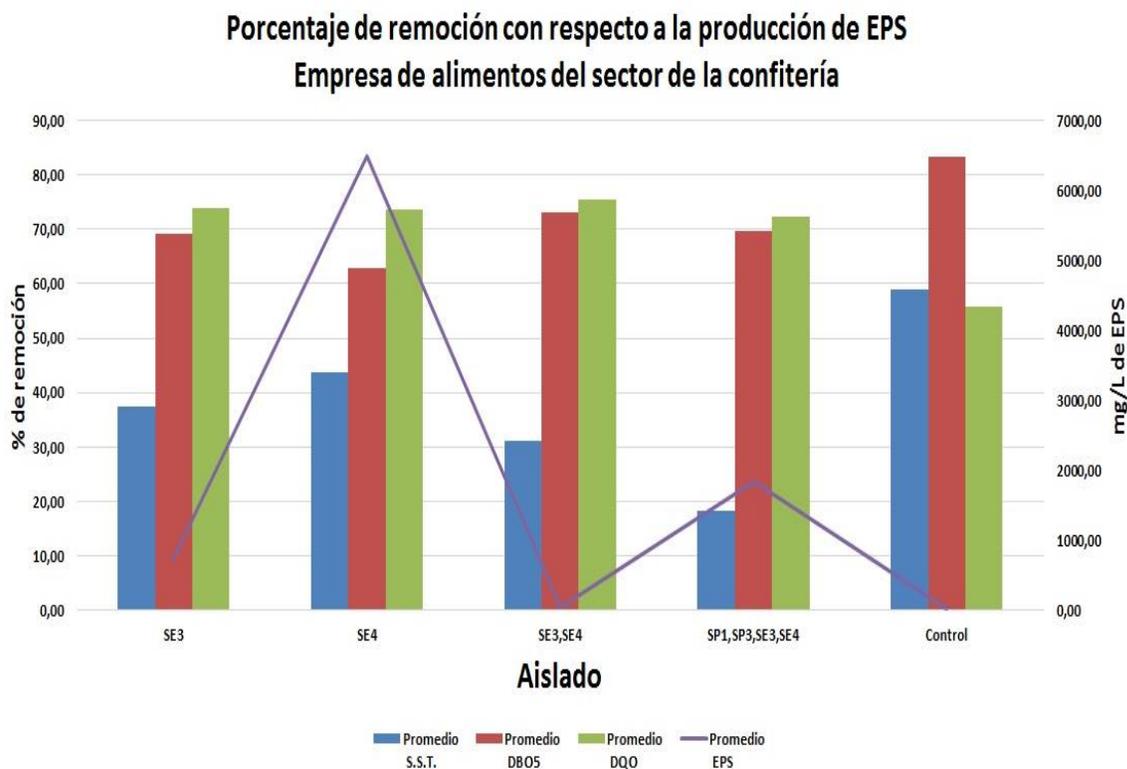
Comparando las remociones obtenidas con la inoculación de los aislados en cada una de las empresas (figuras 25 y 26) se puede encontrar, que se presenta en promedio mayor remoción de DBO<sub>5</sub> en la empresa de alimentos del sector de la confitería con 67,51% en comparación con la de lácteos y del maíz con el 63,67%, en cuanto a S.S.T y DQO la empresa de lácteos y del maíz presentó mayor remoción en S.S.T y DQO con el 79,36% y 75,32% en promedio

respectivamente en comparación con la empresa del sector de la confitería con el 29,42% y 50,41% respectivamente, siendo esta última la de menor producción de PHA con 102,78 mg/L con respecto a 250,69 mg/L obtenido en la empresa de lácteos y del maíz.



**Figura 27. Porcentaje de remoción con respecto a la producción de EPS en una empresa de alimentos lácteos y del maíz**

En la figura 27 se observa que los aislados NE3, NE9 y el consorcio NE3-NE9, alcanzan una producción de 225,00 mg/L, 463,89 mg/L y de 569,44 mg/L respectivamente, los niveles de remoción de S.S.T., DBO<sub>5</sub>, y DQO son más bajos que la remoción obtenida por el consorcio NP2-NP4-NE3-NE9, consorcio que obtuvo una producción de EPS DE 113,89 mg/L correspondiente al 20% del producido por el consorcio NE3-NE9, mientras que sus niveles de remoción alcanzaron niveles del 95,12% en S.S.T., 98,45% en DBO<sub>5</sub> y 74,80% en DQO. En la gráfica es muy apreciable que el consorcio NE3-NE9 presenta una remoción muy baja de DBO<sub>5</sub>.



**Figura 28. Porcentaje de remoción con respecto a la producción de EPS en una empresa de alimentos del sector de la confitería**

La figura 28 indica que el aislado SE4 fue un gran productor de biopolímero (Ver anexo E) con respecto a todos los aislados estudiados dando una tasa de producción de 6.483 mg/L, con unas tasas de remoción para S.S.T. de 43,83%, para DBO<sub>5</sub> de 62,98% y para la DQO del 73,68%, es de tener en cuenta que la remoción obtenida en cuanto a S.S.T. y DBO<sub>5</sub> es superada por la muestra control, pero su producción de EPS es relativamente baja con un valor de 25 mg/L que corresponde al 0,39% de lo producido por el aislado SE4.

Ahora si comparamos las remociones obtenidas con la inoculación de los aislados en cada una de las empresas (figuras 27 y 28) se puede encontrar, que se presenta en promedio mayor remoción de DBO<sub>5</sub> y DQO en la empresa de alimentos del sector de la confitería con 68,72% y 73,78% respectivamente en comparación con la de lácteos y del maíz con el 48,48% y 64,20% respectivamente, lo contrario sucedió con los resultados de S.S.T. donde

se encontró que la empresa de lácteos y del maíz registro una remoción en promedio del 78,34% en comparación con el 32,64% con respecto a la empresa del sector de la confitería., siendo esta última la que presentó mayor producción de EPS con un promedio de 2.2279 mg/L, comparado con 343,06 mg/L de la empresa de lácteos y del maíz.

## 8. Conclusiones y recomendaciones

### 8.1 Conclusiones

Para la empresa de alimentos lácteos y del maíz, los aislados que en medio sintético presentaron mayor producción de PHA fueron NP2 y NP4, y los de mayor producción de EPS fueron NE3 y NE9, resultados que permitirían ser el punto de partida para su evaluación en sistemas continuos.

Para la empresa de alimentos del sector de la confitería, los aislados que en medio sintético presentaron mayor producción de PHA fueron SP1 y SP6, y los de mayor producción de EPS fueron SE3 y SE4, siendo este último el de mayor importancia por su alta producción, lo que lo hace un buen candidato para continuar estudios en sistemas continuos.

Las curvas de crecimiento de cada aislado en medio sintético mostraron comportamientos semejantes a las curvas teóricas reportadas, mientras que el comportamiento del pH mostró una tendencia aproximadamente simétrica pero en sentido opuesto, debido al metabolismo de los aislados.

En el ensayo piloto, el pH fue la variable de mayor importancia que permitió establecer los puntos de muestreo donde se encontraron las mayores tasas de remoción de sólidos suspendidos totales.

Para la empresa de lácteos el consorcio NP2-NP4-NE3- presentan una mayor efectividad en remoción obteniéndose valores de 95,12% en sólidos suspendidos totales, 98,45% en demanda bioquímica de oxígeno en cinco días y 74,80% para la demanda química de oxígeno.

Para la empresa del sector de la confitería la mejor remoción en cuanto a sólidos suspendidos totales y demanda bioquímica de oxígeno en cinco días se presentó por parte de la muestra cruda, lo que indica la escasa eficiencia de los aislados en estudio.

Dentro de este estudio se encontró que a mayor producción de PHA y EPS, menor es la tendencia a la remoción de DBO<sub>5</sub>, DQO y S.S.T.

El aislado SE4 productor de exopolisacárido en los afluentes de la empresa de la confitería, presentó la mayor producción con un valor de 6483 mg/L y una remoción de S.S.T. de 43,83%, DBO<sub>5</sub> de 62,98% y DQO del 73,68%, lo que permite tener en cuenta este afluente como una fuente de carbono importante para el desarrollo de esta técnica de aprovechamiento de residuos orgánicos a nivel industrial.

## **8.2 Recomendaciones**

Realizar caracterización de otros micronutrientes que permitan tener más bases para el análisis de en el comportamiento de los aislados.

Caracterizar molecularmente los aislados a fin de conocer sus características e identificación para posteriores estudios.

Contar con accesos a equipos de cromatografía de gases masas para la caracterización del polímero producido.

Realizar estudios con muestras de tamaños superiores y equipos que permitan cuantificar gravimétricamente la producción de EPS y PHA.

Continuar el estudio con sistemas de flujo continuo, con la incorporación de otros sistemas de depuración adicional, que permitan escalar el diseño experimental a nivel de planta piloto.

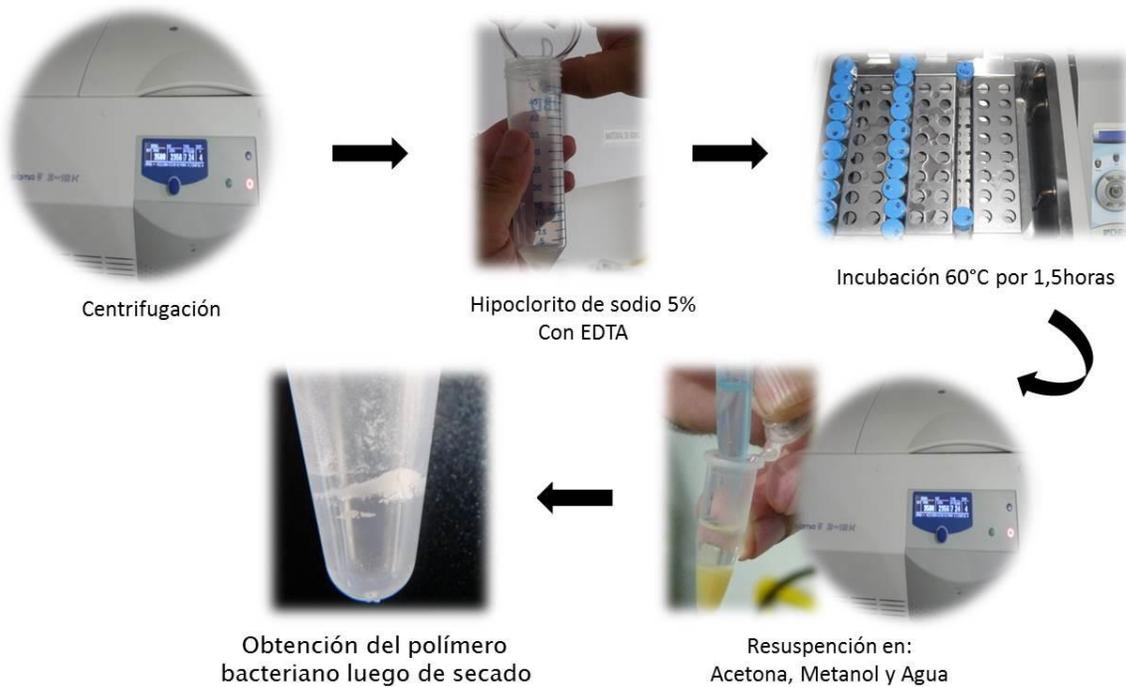
Continuar el estudio con el aislado SE4 que muestra gran potencial productor de exopolisacárido, en otros tipos de afluentes industriales y domésticos.

## 9. Anexos

### Anexo A. Extracción de PHA

#### EXTRACCION DE PHA

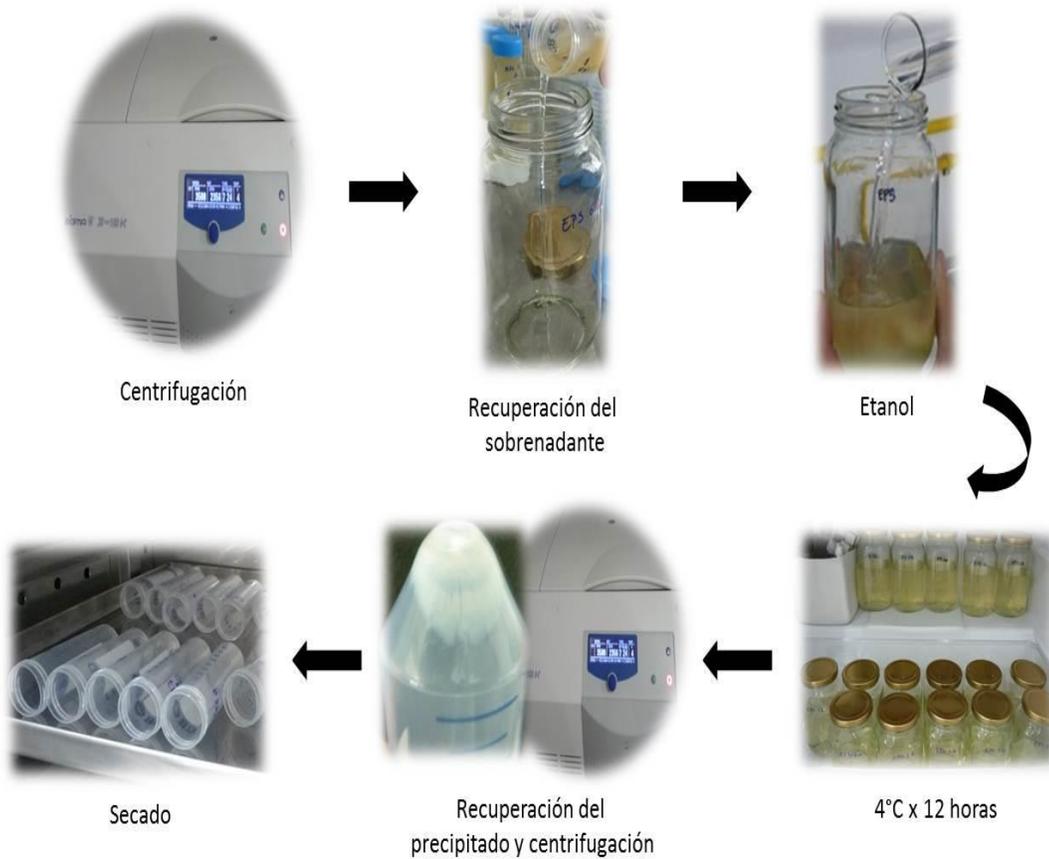
(Fernández, Ortiz, España; 2005 con modificaciones)



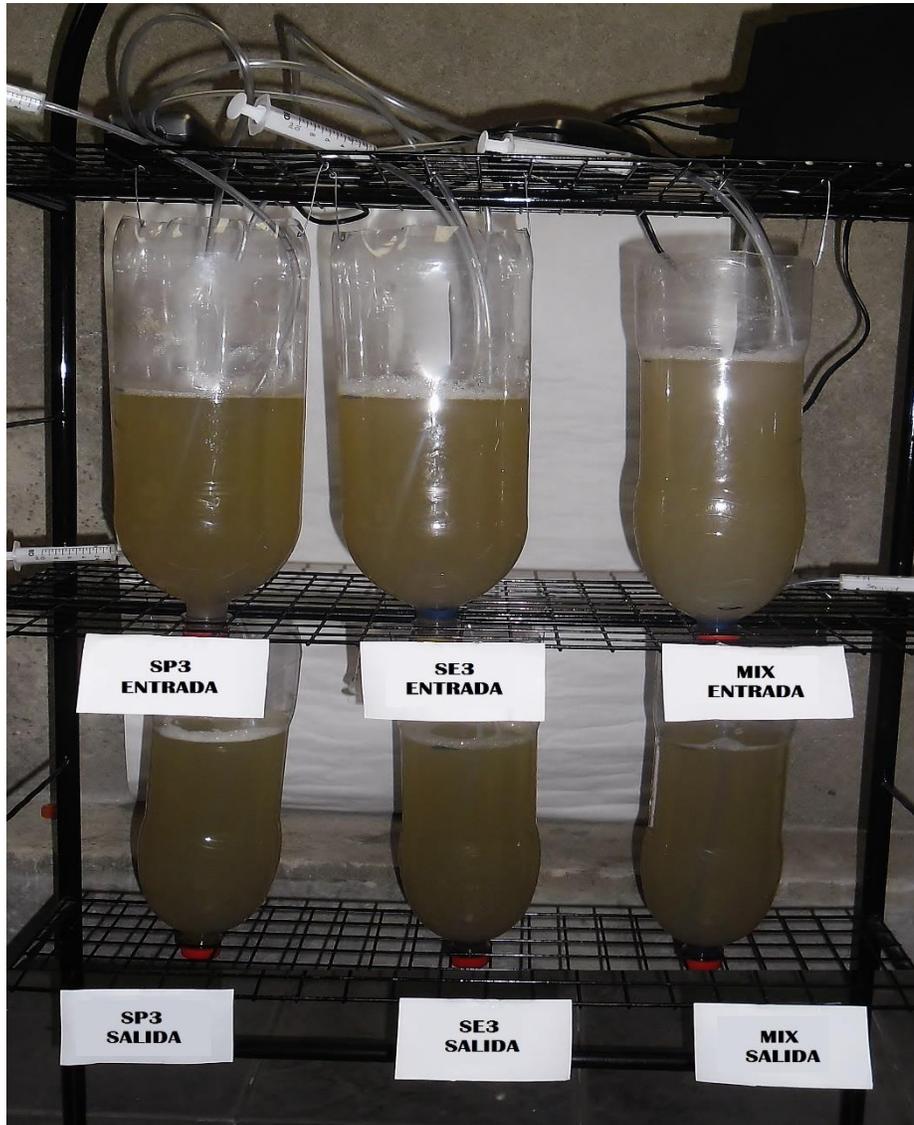
## Anexo B. Extracción de EPS

### EXTRACCION DE EPS

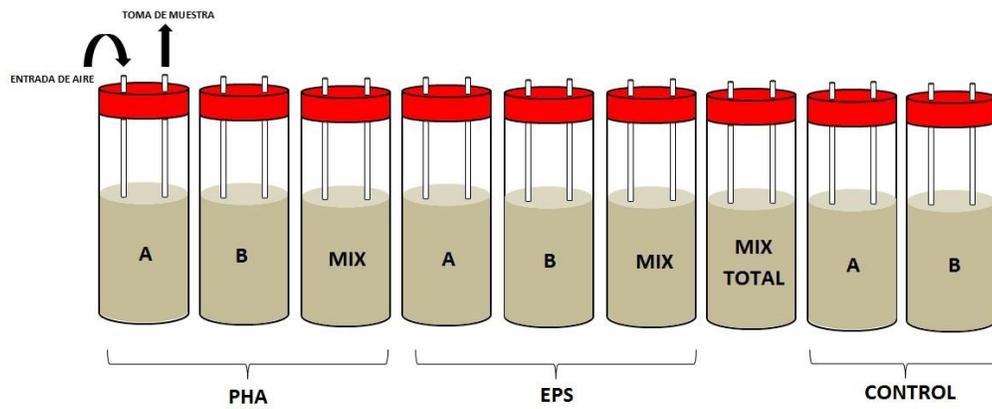
(Torres, Erazo, Fernández, Villota-Calvachi, 2011 con modificaciones)



## Anexo C. Montaje prueba piloto



## Anexo D. Esquema montaje biorreactores



## Anexo E. Características de los aislados de la empresa de alimentos del sector de los lácteos y del maíz.

### Empresa de alimentos del sector de los lácteos y del maíz

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS							
CODIGO INICIAL	POLIMERO	GRAM	FORMA	TINCIÓN SUDAN NEGRO 24 HORAS	TINCIÓN SUDAN	TINCIÓN SUDAN	TINCIÓN NEGATIVA
124	EPS	+	Bacilos cortos	+(d)	+(d)	+	+
131	EPS	+	Bacilos largos	+(d)	+(d)	+	-
139	PHA	+	Bacilos cortos en panal	-	-	-	-
150	PHA	-	Bacilos cortos	-	-	-	+

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS										
CODIGO INICIAL	POLIMERO	FORMA	MARGEN	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	TEXTURA	PROPIEDAD ÓPTICA	TAMAÑO	CONFIGURACIÓN	COLOR
124	EPS	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Arrugada	Beige
131	EPS	Circular	Entero	Elevado	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Beige
139	PHA	Circular	Entero	Elevado	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Concéntrica	Beige
150	PHA	Irregular	Irregular	Plana	Lisa	Cremosa	ante y traslu	Grande	Irregular y extendida	Beige

PRUEBAS BIOQUIMICAS										
CODIGO INICIAL	POLIMERO	TSI						LIA		
		RESULTADO	GLUCOSA	LACTOSA	SACAROSA	H <sub>2</sub> S	GAS	RESULTADO	H <sub>2</sub> S	LISINA
124	EPS	A/A	+	+	+	-	+	K/A	-	-
131	EPS	A/A	+	+	+	-	+	K/A	-	-
139	PHA	A/A	+	+	+	-	-	A/A	-	-
150	PHA	A/A	+	+	+	-	+	K/K	-	+

CODIGO INICIAL	CITRATO DE	UREA	ROJO DE METILO 72h	VOGES PROSKAUER 72h	SIM		
					H <sub>2</sub> S	INDOL	MOTILIDAD
124	+	+	+	+	-	-	+
131	+	+	+	-	-	+	+
139	-	+	+	-	-	-	-
150	+	+	+	+	-	-	+

CODIGO INICIAL	POLIMERO	GLUCOSA	SACAROSA	GAS A PARTIR DE GLUCOSA	ARABINOSA	LACTOSA	MANOSA	RAMNOSA	XILOSA	FRUCTOSA
124	EPS	+	+	+	+	+	+	+	+	+
131	EPS	+	+	+	+	+	+	+	+	+
139	PHA	+	+	-	+	+	+	+	+	+
150	PHA	+	+	+	+	+	+	+	+	+

CODIGO INICIAL	RIBOSA	MANITOL	MALTOSA	GALACTOSA	CATALASA	OXIDASA
124	+	+	+	+	+(d)	-
131	+	+	+	+	-	-
139	+	+	+	+	-	-
150	+	+	+	+	+	-

## Anexo F. Características de los aislados de la empresa de alimentos del sector de la confitería.

### Empresa de alimentos del sector de la confitería

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS							
CODIGO INICIAL	POLIMERO	GRAM	FORMA	TINCIÓN SUDAN NEGRO 24 HORAS	TINCIÓN SUDAN	TINCIÓN SUDAN	TINCIÓN NEGATIVA
88	EPS	-	Bacilos cortos	-	+(d)	+	+
97	EPS	-	Bacilos cortos en panal	-	-	-	-
101	PHA	-	Bacilos cortos	-	-	-	+
104b	PHA	-	Bacilos cortos	+(d)	+(d)	+	+

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS										
CODIGO INICIAL	POLIMERO	FORMA	MARGEN	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	TEXTURA	PROPIEDAD ÓPTICA	TAMAÑO	CONFIGURACIÓN	COLOR
88	EPS	Irregular	Entero	Elevado	Lisa	Cremosa	Opaca	Grande	Irregular y extendida	Beige
97	EPS	Irregular	Ondulado	Elevado	Lisa	Cremosa	Brillante	Grande	Irregular y extendida	Beige
101	PHA	Irregular	Ondulado	Elevado	Lisa	Cremosa	Brillante	Grande	Irregular y extendida	Beige
104b	PHA	Circular	Entero	Elevado	Lisa	Cremosa	Brillante	Mediana	Redonda	Blanco

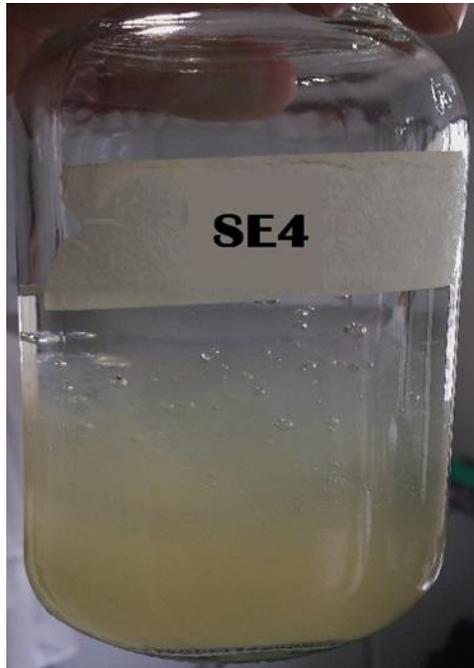
PRUEBAS BIOQUIMICAS										
CODIGO INICIAL	POLIMERO	TSI						LIA		
		RESULTADO	GLUCOSA	LACTOSA	SACAROSA	H <sub>2</sub> S	GAS	RESULTADO	H <sub>2</sub> S	LISINA
88	EPS	A/A	+	+	+	-	-	K/A	-	-
97	EPS	A/A	+	+	+	-	-	K/A	-	-
101	PHA	A/A	+	+	+	-	+	K/A	-	-
104b	PHA	A/A	+	+	+	-	+	K/K	-	+

CODIGO INICIAL	CITRATO DE	UREA	ROJO DE METILO 48h	VOGES PROSKAUER 48h	SIM		
					H <sub>2</sub> S	INDOL	MOTILIDAD
88	+	-	-	+	-	-	+
97	+	+	+	-	-	-	+
101	+	+	-	+	-	-	+
104b	+	+	+	+	-	-	+

CODIGO INICIAL	POLIMERO	GLUCOSA	SACAROSA	GAS A PARTIR DE GLUCOSA	ARABINOSA	LACTOSA	MANOSA	RAMNOSA	XILOSA	FRUCTOSA
88	EPS	+	+	+	+	+	+	+	+	+
97	EPS	+	+	-	-	+	+	+	+	+
101	PHA	+	+	-	-	+	+	+	+	+
104b	PHA	+	+	+	+	+	+	+	-	+

CODIGO INICIAL	RIBOSA	MANITOL	MALTOSA	GALACTOSA	CATALASA	OXIDASA
88	+	+	+	+	+	+
97	-	+	+	+	+	+
101	+	+	+	+	+	+
104b	-	+	+	+	+	-

## Anexo G. Biopolímeros sintetizados por el aislado SE4



## 10. BIBLIOGRAFIA

- Abril, A. (2005). Manejo de hábitat y microorganismos para degradar efluentes industriales: un estudio de caso. Recuperado de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1667-782X2005000100002](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-782X2005000100002). Consultado (22-05-2012).
- Agardy, T., A. Inés, B. Jane, P Ramón, P, Erica, R. Jamie y E. Shoch (2008) El mosaico de America del Norte. Canada: Comisión para la cooperación ambiental.
- Amemura, A., Harada T. (1983). Structured studies on extracellular acidic polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. Applied and Environmental Microbiology. 54, 2381 – 2386.
- Arellano, J. D. (2002). Introducción a la ingeniería ambiental, Instituto Politécnico Nacional, Alfa Omega. México. Grupo Editor S.A.
- Ashm, B., Caliskan, F., Beyath, Y. & Gündüz U. (1998). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology letters, 159, 293-297.
- Banco de patentes. Superintendencia de Industria y Comercio. Recuperado de: <http://www.sic.gov.co/es/web/quest/banco-patentes>. Consultado (15-05-2012).
- Banacore, A., Martínez, G., Saravia, V. (2012). XVII Congreso Interamericano de Ingeniería Química. Cartagena. Recuperado de <http://aiquruquay.org/congreso/download/P89.pdf>. Consultado (30-11-2013)

- Bastidas, J.C. & Ramírez, L.C. (2007) Determinación de la carga contaminante de origen industrial, vertida sobre la quebrada Manizales. (Tesis de especialidad). Universidad Nacional de Colombia. Manizales.
- Becker J.M. (1996). Biotecnología: Curso de prácticas de laboratorio. Madrid. Editorial Acribia S.A.
- Bernd, H. A. Rehm. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nature Reviews microbiology. Institute of Molecular Biosciences, Massey University. New Zeland.
- Belloso, C. (2000). Desarrollo de cepas microbianas autóctonas con capacidad degradadora de sustancias orgánicas contenidas en efluentes industriales. Recuperado de [http://biogroup.com.ar/es/publicaciones/Paper\\_frigorifico.pdf](http://biogroup.com.ar/es/publicaciones/Paper_frigorifico.pdf). Consultado (21-05-2012).
- Bitton, G. (2005). Wastewater Microbiology. Third Edition. John Willey & Sons, Inc. WILEY Series in Ecological and Applied Microbiology.
- Bramucci, M.G., Nagarajan, V. (2000). Industrial wastewater biorreactors: sources of novel microorganisms for biotechnology. Trends Biotechnol. 18, 501-505.
- Bravo, M., Moreno, A., Henández, C., Yeomans, J., y Okumoto, S. (2005). Implementación y monitoreo de la etapa inicial del sistema de tratamiento de aguas residuales del laboratorio de procesamiento de alimentos de la Universidad EARTH. Tierra tropical. 1, 89 – 97.
- Cardona, M., Agudelo, L. (2012). Producción de bioplásticos a partir de bacterias empleando sustratos no convencionales. Grupo de Biotransformación Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia. Recuperado de <http://www.udea.edu.co/portal/page/portal/bibliotecaSedesDependencias/unidadesAdministrativas/SIU/Diseno/Documentos/Tab2/PRODUCCION%20DE%20BIOPLASTICOS%20A%20PARTIR%20DE%20BACTERIAS%20EMPLEANDO>

[O%20SUSTRATOS%20NO%20CONVENCIONALES.%20Mariana%20Cardona.pdf](#)

Consultado (02-12-2013).

- Carrillo, L. (2003). Microbiología agrícola. Recuperado de <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagriapendice.pdf> Consultado (30-11-2013).

Corporación Andina de Fomento (CAF). (2003). Posibilidades de la biotecnología para el uso sostenible de los recursos de biodiversidad en la región andina: recomendaciones y directrices estratégicas. Recuperado de <http://www.eclac.cl/caf/noticias/paginas/7/21327/biotecnologia.pdf> Consultado (25-05-2012).

- De Almeida, A., Ruiz, J., Lopez, N. & Pettinari, J. (2004). Bioplásticos: Una alternativa ecológica. Revista química viva., 3, 122-133. Recuperado de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v3n3/pettinari.htm> Consultado (11-10-2013).
- Díaz, C., M.; Espitia, S., Molina, F. (2002). Digestión Anaerobia una Aproximación a la Tecnología. Bogotá. Unibiblios.
- Fernández, A., García, C., Saéz, J., Ramos, S. (2010). Procedimientos en Microbiología Clínica. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf> Consultado (12-12-2013).
- Glazer, A.N. y Nikaido, H. (1995). Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. W. H. Freeman and Company, New York.
- Graber, M., Morin, A., Duchiron, F., Monsan, P.F. (1998). Microbial polysaccharides containing 6-deoxysugars. Enzyme and Microbial Technology. 10, 198-205.
- Hantula, J., Bamford, H. (1991). The efficiency of the protein-dependent flocculation of *Flavobacterium* sp. is sensitive to the composition of growth médium. Appl Microbiol Biotechnol 36,100-104.

- Hantula, J., Bamford, H. (1991). Bacteriophage resistance and flocculation deficiency of *Flavobacterium* sp. are phenotypically interrelated. *Appl Microbiol Biotechnol* 36,105-108.
- Jendrossek, D. & Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates, *Annu. Rev. Microbiol*, 56, 403–432.
- Kang, K.s., Cottrell, I.W. (1979). Polissaccharides Microbial. Tecnology. Pepler H. J y Perlman D. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. London. 1, 471-481.
- Kim, D., Robyt, F., \* Lee S-Y., Lee, J-H., Kimd, Y-M. (2003). Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase. *Carbohydrate Research*. 338, 1183–1189.
- Kumar, T. (2008). Studies on microbial degradation of biological wastes for production of polyhydroxyalkanoates. (Tesis doctoral) Institute of Genomics and Integrative Biology (CSIR). Delhi.
- Lemoine, J., Chirat, F. Wieruszkeski, JM., Strecker, G.m., Fure, N., Neeser. JR. (1997). Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* sFi 39 and sFi 12. *Applied and environmental microbiology*.63, 3512.3513.
- Li, Q. (2006). Preparation, Purification And Application Of Bioflocculant Excreted From *Agrobacterium Radiobacter*. Globe Thesis. Recuperado de <http://www.globethesis.com/?t=1101360155467154> Consultado (05-12-2013).
- MacFADDIN, Jean F. (1985). Media for Isolation, Cultivation, Identification and Maintenance of Medical Bacteria. Volume 1. United States of America.

- 
- Madiedo, P. Ruas, Gavilan C.G. Methods for the Scening, Isolation, and Characterización of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. Journal Dairy Sci. 88, N3, 843-856.
  - Madigan, M., Marinko J. & Parker, J. (2003) Biología de los microorganismos. Madrid. Editorial Pearson.
  - Malpartida, Z., Lucia, K. (2005). Lactobacilos nativos productores de exopolisacáridos de interés biológico. (Tesis). Universidad Nacional de San Marcos. Facultad de farmacia y bioquímica. Lima. Recuperado de [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1277/1/zamudio\\_mk.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1277/1/zamudio_mk.pdf) Consultado (11-12-2013).
  - Merchuck, J. (1994). Microbiología Industrial. Ben Gurion University. Israel.
  - Ministerio de Salud de Colombia. (1984) Decreto 1594. (Publicado en el Diario Oficial No. 38700). Recuperado de [http://www.minambiente.gov.co/documentos/dec\\_1594\\_260684.pdf](http://www.minambiente.gov.co/documentos/dec_1594_260684.pdf) Consultado (12-06-2012).
  - Ministerio de Desarrollo Económico de Colombia. Dirección de Agua Potable y Saneamiento Básico. (2000). RAS 2000. Capitulo E. Recuperado de <http://www.minambiente.gov.co/documentos/TituloE.PDF> Consultado (12-06-2012).
  - Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial de Colombia. (2002). Guía ambiental. Formulación de planes de pre-tratamiento de efluentes industriales. Recuperado de [http://www.minambiente.gov.co/documentos/Efluentes\\_industriales.pdf](http://www.minambiente.gov.co/documentos/Efluentes_industriales.pdf) Consultado (27-08-2012).
  - Ministerio del Medio Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de Colombia. (2002). Guía ambiental. Gestión para el manejo, tratamiento y disposición final de las aguas residuales municipales. Recuperado de

[http://www.minambiente.gov.co/documentos/Aguas\\_Municipales.pdf](http://www.minambiente.gov.co/documentos/Aguas_Municipales.pdf) Consultado (27-08-2012).

- Moon, C.I., Lee, J.H. (2004) Use of curdlan and activited carbón composed adsorbents for heavy metal removal. *Process Biochemistry*. 40, 1279-1283.
- Neira, A. y Pardo, L (2010). Trabajo revisión bibliográfica biopolímeros: Poliésteres. Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia. Recuperado de <http://poliesteres.files.wordpress.com/2010/04/ojotrabajo-final-poliesteres.pdf>. Consultado (20-05-2012).
- Nyman, A. K. (2010). Influence of conditions on fed-batch production of polihidroxyalkanoatos in mixed culture. (Tesis de maestría), Universidad de Lund, Suecia.
- Otero, Ivan. (2012). Remoción de materia orgánica de las aguas residuales vertidas al río pasto con bacterias productoras de polihidroxiacanoatos. (Tesis de maestría). Universidad de Nariño. Pasto.
- Paris-Ripol, X. (2009). Obtención de exopolisacáridos de interés industrial a partir del lactosuero y permeatos. (Tesis doctoral). Universidad de Granada. Granada. Recuperado de <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/2376/1/18101604.pdf> Consultado (23-06-2012).
- Patil,S.,Patil, C., Salunke, B., Salunke, R., Bathe, G., Patil, D. (2011). Studies on Characterization of Bioflocculant Exopolysaccharide of *Azotobacter indicus* and Its Potential for Wastewater Treatment. *Appl Biochem Biotechnol* 163,463–472.
- Rehm, H.A. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications, *Nature Reviews Microbiology*. 8, 578-592.
- Rodríguez, A., L. Pedro, R, Roberto, D. Miriam, V. Susana y S. Juana (2006). *Tratamientos avanzados de aguas residuales*. Madrid. Fundación para el conocimiento.

- 
- Rodríguez, J.L. & Martín J.S. (2003). Biorremediación: fundamentos y aspectos microbiológicos. *Industria y minería*, (351), 12-16.
  - Rittmann Bruce E., McCarty Perry L.; (2001) *Environmental Biotechnology: Principles and Applications McGraw-Hill Series in Water Resources and Environmental Engineering*.
  - Rivera, L. A. & Nevarez, G. (2009). Fuentes de carbono económicas para la producción de bioplásticos bacterianos. *Tecnociencia*. 3(2), 58-65 recuperado de [http://www.academia.edu/4212088/Fuentes\\_de\\_carbono\\_economicas\\_para\\_la\\_produccion\\_de\\_bioplasticos\\_bacterianos](http://www.academia.edu/4212088/Fuentes_de_carbono_economicas_para_la_produccion_de_bioplasticos_bacterianos) Consultado (08-12-2013).
  - Roller, S., Dea, I.C.M. (1992). Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. *Critical Reviews in Biotechnology*. 12, 261-277.
  - Salehizadeh, H., Shojaosadati, S.A. (2001). Extracellular biopolymeric flocculants Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*. 19,371–385.
  - Sanderson, G.R., Clarke, R.C. (1983). Gellan gum. *Food Technology*. 37, 63-70.
  - Shimofuruya, H., Koide, A., Shirota, K., Tsuji, T., Nakamura, M., Suzuki, J. (1996). The production of flocculating substance(s) by *streptomices griseus*. *Biosci. Biotech. Biochem*, 60 (3), 498-500.
  - Sierra, C. A. (2011). *Calidad del agua, evaluación y diagnóstico*. Universidad de Medellín. Medellín.
  - Sutherland, I.W. (1988). Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *Int. Rev. Cytol.* (113).
  - Sutherland I.A., (1990). *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*, Cambridge University Press. Cambridge.

- Tchobanoglous, G. (1995). Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Volumen I. McGraw – Hill/Interamericana de España. Madrid.
- Torres, R. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente. 2, 1-5.
- Torres, S., Erazo, D., Fernandez, P. y Villota, G. (2011). Bacterias ácido lácticas con potencial industrial en la producción de exopolisacáridos. En J. Branch (Presidencia), Biofábricas. Simposio llevado a cabo en el I congreso internacional de flujo de reactivos. Medellín. Colombia
- Valappil, S.P; Boccaccini, A.R; Bucke, C., Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*, Antonie van Leeuwenhoek, volumen (91), 1–17.
- Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D. & Radecka, I.(2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of Applied Microbiology. 102, 1437–1449.
- Von Sperling, M. (2005). Introducción a la calidad del agua y al tratamiento de aguas residuales. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- Zapata, P., Rojas D., Fernández, C., Ramírez D. Restrepo, G., Orjuela V., Arroyave, M., Gómez, T., Atehortúa Lucía Atehortúa, L. (2007). Producción de biomasa y exopolisacáridos de grifola frondosa bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. Revista EIA. 7, 137-144.
- Zaror C. (2000). Introducción a la ingeniería ambiental para la industria de procesos. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.