



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS COMO
POTENCIALES AGENTES PARA BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES EN UNA
EXTRACTORA DE PALMA ACEITERA”**

**TESIS PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

PAOLA DANIELA RODRIGUEZ ZAMBRANO

RIOBAMBA – ECUADOR

2011

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios
por haberme dado la vida a lado de mi familia,
a mis Padres agradezco su apoyo incondicional
para seguir adelante aun en la adversidad,
Gracias porque nunca dejaron de creer en mi.

Mi más grato reconocimiento a la Dra. Jenny Moreno
Directora de Tesis Gracias
por su dedicación y comprensión,
al Dr. Fausto Yaulema por su colaboración.

Y por último pero no menos importante quiero agradecer
a las personas que me apoyaron durante
la ejecución de mi tesis, Lcdo. Elías Tuquerres,
Ing. Camilo Haro y de manera
especial a la Dra. Rocío Yambay
su esposo Ing. José Samaniego
Gracias por abrirme las puertas de su hogar
y tratarme como a una hija,
sin su ayuda no hubiera culminado mi proyecto,
Gracias de corazón, los quiero mucho que Dios los Bendiga.

DEDICATORIA

*Consagro no solo este trabajo sino mi vida entera
a mi preciosa hija Doménica gracias por existir.*

*A mis padres Luis y Mariana dedico este trabajo,
siempre dejaron de lado sus necesidades para suplir las mías,
Uds. me enseñaron con su ejemplo
que en la vida es necesario sacrificarse
para cumplir nuestras metas.*

*La vida cambia sin preguntarnos si nos gusta o no,
si nos va a doler o si tenemos la fuerza suficiente para resistirlo;
en lo personal la vida se llevo dos personas
a las que amaba mucho y aunque
hasta hoy me hacen falta
tengo la esperanza que al final de mis días
nos reencontraremos.*

*A ti mi Elyta querida Gracias
por brindarme Tu amistad que trasciende esta vida.*

*Y a mi ñañita linda Daniela Gracias
por enseñarme a sonreír aún en la tristeza más grande*

FIRMAS RESPONSABLES

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS COMO POTENCIALES AGENTES PARA BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES EN UNA EXTRACTORA DE PALMA ACEITERA”**, de responsabilidad de la señorita egresada Paola Daniela Rodríguez Zambrano, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Yolanda Días DECANA FACULTAD DE CIENCIAS	_____	_____
Dr. José Vanegas. DIRECTOR. ESC.CIENCIAS QUIMICAS	_____	_____
Dra. Mayra Espinoza DELEGADA DE LA DECANA	_____	_____
Dra. Jenny Moreno. DIRECTORA DE TESIS	_____	_____
Dr. Fausto Yaulema. COLABORADOR DE TESIS	_____	_____
Lcdo. Carlos Rodríguez. DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	

~ 5 ~

Yo, Paola Daniela Rodríguez Zambrano,
soy responsable de las ideas, doctrinas y
resultados expuestos en esta Tesis; y el
patrimonio intelectual de la Tesis de Grado,
pertenece a la ESCUELA SUPERIOR
POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A:	mL de sulfato ferroso amoniacal para el blanco
AGV:	ácidos grasos volátiles.
B:	mL de sulfato ferroso amoniacal para la muestra
°C:	Grados Centígrados
COS:	Carga orgánica superficial
COV:	Carga orgánica volumétrica
DBO ₅ :	Demanda Bioquímica de oxígeno
DQO:	Demanda química de oxígeno
F:	Factor de dilución (veces que la muestra es diluida)
L:	Litros
m ² :	metros cuadrados
m ³ :	metros cúbicos
mg/L:	miligramos / litros
ml:	Mililitros
min:	Minutos
N:	Normalidad del sulfato ferroso amoniacal: 0.25 N
pH:	potencial hidrógeno
Pot:	Potencia
ST:	Sólidos totales
T:	Tiempo
TN:	Tonelada
V:	Volumen de la muestra
W ₁ :	Peso cápsula más muestra fresca
W ₂ :	Peso de cápsula más muestra seca
W ₃ :	Peso del balón vacío
W ₄ :	Peso del balón más el aceite extraído
W ₅ :	Peso del aceite extraído
8000:	Peso equivalente del oxígeno multiplicado por 1000 (mL a L)
20000:	Constante

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE GRAFICOS.....	9
ÍNDICE DE FOTOS.....	10
ÍNDICE DE ANEXOS.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
ANTECEDENTES.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	15
OBJETIVOS.....	16
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO.....	17
1.1 PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE PALMA AFRICANA.....	16
1.1.1 La esterilización.....	18
1.1.2 Desfrutación.....	19
1.1.3 La digestión	19
1.1.4 Prensado.	20
1.1.5 La clarificación.	21
1.2 SISTEMA DE TRATAMIENTO DEL EFLUENTE DE PROCESO.....	22
1.2.1 Tratamientos preliminares.	22
1.2.2 Pozos florentinos.	23
1.2.3 Laguna de desaceitado, enfriamiento y equalización de caudales.....	23
1.2.4 Lagunas anaerobias.....	24
1.2.5 Lagunas facultativas.	25
1.2.6 Control del sistema de lagunas de oxidación.....	26
1.3 SIEMBRA Y AISLAMIENTO	28
1.3.1 Siembra.	28
1.3.2 Aislamiento.	30
1.4 MICROORGANISMOS PRESENTES EN AGUAS RESIDUALES.....	33
1.4.1 Bacterias.	33
1.4.2 Hongos.....	33
1.4.3 Protozoos.	33

1.4.4	Metazoos.....	34
1.4.5	Algas microscópicas.....	34
CAPÍTULO 2.- PARTE EXPERIMENTAL		35
2.1	MUESTREO.....	35
2.2	METODOLOGÍA.....	35
2.2.1	Métodos y Técnicas.....	35
2.3	DATOS EXPERIMENTALES.....	42
2.3.1	Diagnóstico.....	42
CAPÍTULO 3.- LÍNEA DE INVESTIGACIÓN.....		43
3.1	CÁLCULOS.....	43
3.1.1	Cálculos empleados en la caracterización del residual.....	43
3.1.2	Cálculos de la DQO en las pruebas de degradación.....	45
3.2	RESULTADOS.....	47
3.2.1	Resultados de la caracterización del residual.....	48
3.2.2	Resultados de la identificación de los microorganismos.....	48
3.2.3	Prueba de degradación con los diferentes microorganismos.....	49
3.3	PROPUESTA.....	52
3.4	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
CAPÍTULO 4.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		67
4.1	CONCLUSIONES.....	67
4.2	RECOMENDACIONES.....	68
RESUMEN.....		69
SUMMARY.....		70
BIBLIOGRAFÍA.....		71
ANEXOS.....		77
FOTOGRAFÍAS.....		88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales.....	40
Tabla 2. Cálculos de sólidos totales.....	43
Tabla 3. Cálculos de aceites y grasas.....	44
Tabla 4. Cálculo de pH.....	44
Tabla 5. Cálculo de temperatura.....	45
Tabla 6. Cálculo de DQO en pruebas de degradación con concentración al 5%.....	45
Tabla 7. Cálculo de DQO en pruebas de degradación con concentración al 25%.....	46
Tabla 8. Cálculo de DQO en pruebas de degradación con concentración al 50 %.....	47
Tabla 9. Caracterización del residual.....	48
Tabla 10. Resultados de la prueba de degradación al 5%.....	49
Tabla 11. Resultados de la prueba de degradación al 25%.....	50
Tabla 12. Resultados de la prueba de degradación al 25%.....	51
Tabla 13. Porcentajes de remoción de carga orgánica con <i>brevundimonas</i>	52
Tabla 14. Denominación de factores.....	53
Tabla 15. Anova.....	54
Tabla 16. Factor a microorganismos con el método lsd.....	55
Tabla 17. Factor b tratamiento con el método lsd.....	56
Tabla 18. Factor c concentración con el método lsd.....	58

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Proceso de extracción.....	17
Gráfico 2. Lagunas de oxidación.....	21
Gráfico 3. Esquema de los subproductos y residuos del proceso de extracción.....	27
Gráfico 4. Siembra microbiológica.....	28
Gráfico 5. Cultivo en medio líquido.....	28
Gráfico 6. Cultivo en medio sólido.....	29
Gráfico 7. Aislamiento por estrías y por dilución.....	30
Gráfico 8. Diagrama de diluciones.....	38
Gráfico 9. Diagrama de las pruebas de degradación.....	39
Gráfico 10. Factor a microorganismos con el método lsd.....	55
Gráfico 11. Factor b tratamientos con el método lsd.....	57
Gráfico 12. Factor c concentración con el método lsd.....	59
Gráfico 13. Ilustración de interaction plot factor a vs factor b.....	60
Gráfico 14. Ilustración de interaction plot factor a vs factor c.....	61
Gráfico 15. Residuos vs predichos de la var_1 vs factor c.....	62
Gráfico 16. Residuos vs predichos de la var_1 vs factor c.....	62

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía n° 1. Preparación del medio de enriquecimiento.....	88
Fotografía n° 2. Agitación del medio de enriquecimiento.....	88
Fotografía n° 3. Colonias de <i>brevundimonas diminuta</i>	89
Fotografía n° 4. Colonia de <i>aspergillus</i>	89
Fotografía n° 5. Colonias de <i>aspergillus</i>	90
Fotografía n° 6. Colonias de <i>fusarium</i>	90
Fotografía n° 7. Cepa de <i>fusarium solani</i>	91
Fotografía n° 8. Cepa de <i>fusarium avenaceum</i>	91
Fotografía n° 9. Inicio de las pruebas de degradación.....	92
Fotografía n° 10. Pruebas de degradación sexto día.....	92
Fotografía n° 11. Pruebas de degradación decimo día.....	93
Fotografía n° 12. Pruebas de degradación quince días.....	93

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo n° 1. Instructivo análisis de temperatura.....	77
Anexo n° 2. Instructivo análisis de pH.....	77
Anexo n° 3. Instructivo análisis de sólidos totales.....	77
Anexo n° 4. Instructivo análisis de aceites y grasas.....	78
Anexo n° 5. Instructivo análisis de la demanda química de oxígeno.....	79
Anexo n° 6. Siembra en medio solido.....	82
Anexo n° 7. Identificación de <i>fusarium avenaceum</i>	83
Anexo n° 8. Identificación de <i>fusarium solani</i>	84
Anexo n° 9. Identificación de <i>Aspergillus fumigatus</i>	85
Anexo n° 10. Identificación de <i>brevundimonas diminuta</i>	86
Anexo n° 11. Composición del medio de crecimiento.....	87

INTRODUCCIÓN

La industria palmicultora y de extracción de aceite rojo de palma africana constituyen industrias que causan un alto impacto en el ambiente, por lo que es necesario aplicar tecnologías innovadoras que contribuyan a disminuirlo; así la biotecnología ambiental emplea microorganismos para mejorar la calidad del ambiente, entre estas mejoras están la prevención en la descarga de los contaminantes, limpieza de ambientes contaminados.

La aplicación de principios microbiológicos en la solución de problemas ambientales incluye recuperación de zonas industriales, comerciales, residenciales, etc contaminadas con productos químicos peligrosos, protección y recuperación de ríos, lagos, estuarios, etc de contaminantes ambientales, prevención de la propagación a través del agua o el aire de organismos patógenos entre seres humanos y otras especies, producción de sustancias benignas para el medio, reducción de residuos industriales con objeto de disminuir el consumo de recursos y la producción de contaminantes que requieren su eliminación.

En el caso particular de las extractoras de Aceite rojo de Palma Africana de la zona de Quinindé, éstas cuentan con sistemas de lagunas de oxidación para tratar sus aguas residuales las cuales usan una mezcla de agua residual, lodo y estiércol de búfalo, para degradar la carga orgánica mediante la actividad microbiana, sin embargo estas extractoras no trabajan con un microorganismo específico identificado. El objetivo de la presente investigación es aislar e identificar cepas microbianas que puedan usarse como potenciales agentes para biorremediar efluentes en una extractora de palma aceitera, por medio del método investigativo se aislaron e identificaron en el laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias varios microorganismos presentes en las aguas residuales de esta industria, los que posteriormente se emplearon para investigar su actividad degradativa en las mismas.

Las cepas microbianas aisladas fueron posteriormente identificadas como *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*, y *Brevundimonas diminuta*, con los microorganismos aislados se realizaron las pruebas de degradación en el residual diluido a diferentes concentraciones, dosificando cada microorganismo a tres concentraciones diferentes, se determinó la DQO antes de las pruebas que fue de 8400 mg/L y luego de los tratamientos se consigue disminuir los valores de DQO a 1600 mg/L con *Brevundimonas diminuta* en tanto que con *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus* la disminución de DQO no es representativa; demostrando así que es posible aislar microorganismos nativos y usarlos en la degradación de carga orgánica en los mismos residuales que originalmente los contenían.

ANTECEDENTES

La palma de aceite *Elaeis guineensis* crece alrededor del mundo en una zona de latitud 10°, al norte y sur del paralelo del Ecuador.

Existen varias extractoras ubicadas en el cantón Quinindé de la provincia de Esmeraldas, dedicadas a la extracción de aceite rojo de palma africana, son varias hectáreas de plantación con una capacidad de proceso superior a 160.000 TN/año de fruta procesadas el 15% es fibra, 8% cascarilla, 20% raquis y el 12% lodos, las plantas se abastecen de sus plantaciones y de proveedores.

El procesamiento de la palma de aceite es uno de los más autosuficientes procesos de la industria basada en el agro, aunque también representa el mayor contribuyente a la contaminación del ambiente.

La palma africana de aceite produce dos tipos de productos comerciales: aceite bruto o crudo por aproximadamente un 22% del peso del racimo de fruta fresca y las almendras de palma que representan entre 4 y 6%. Cuando la almendra es procesada, ésta produce aceite de almendra de palma y torta de almendra de palma.

En Colombia, Fedepalma ha realizado investigaciones sobre la “Conversión de efluentes y tusas en fertilizante orgánico con cero desperdicios” y los resultados obtenidos permitieron llegar a la conclusión de que es posible reemplazar las lagunas anaeróbicas para tratamiento de efluentes; eliminando la emisión de metano y, por tanto, mejorar el reciclaje de nutrientes, ayudar a proteger las aguas, el ambiente, y contribuir a la sostenibilidad de las plantaciones de palma de aceite. (27)

En la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, se han realizado varias investigaciones sobre la utilización de residuos de palma africana (raquis, fibra, pulpa) como sustratos para el cultivo de hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* (8); evaluación de fangos activados para su uso como bioabonos.(11), y la utilización de residuos del proceso para aislar microorganismos productores de biosurfactantes (6), tratamiento de aguas residuales por medio de lagunas de oxidación (7), pero, no existe información respecto a estudios sobre la utilización de otros tipos de tratamiento de los efluentes y demás residuos del proceso de la extracción de aceite, para disminuir el impacto que éstos ocasionan al ambiente.

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS

En Ecuador las extractoras de aceite utilizan materias primas, energía, capital y trabajo humano para generar bienes socialmente deseables, pero también, sus procesos de extracción arrojan al ambiente subproductos indeseables altamente contaminantes para los cuales, generalmente, no hay precios positivos ni mercados, los mismos que pueden ser aprovechados y utilizados en procesos biotecnológicos adquiriendo de esta manera un valor agregado.

Actualmente la industria extractora de aceite, tiene un serio compromiso con el ambiente, la realización de esta investigación resulta beneficiosa con el entorno y su equilibrio. Por medio de la aplicación de técnicas de microbiología se aislarán varias cepas de microorganismos que permitan mejorar la degradación de la carga orgánica contaminante en el tratamiento de efluentes de la extractora.

Aislar es separar uno o varios tipos de microorganismos a partir de una población presente en una muestra problema, ya sea de aire, agua o suelo. En hábitats naturales, raramente encontramos a los microorganismos en estado puro, por lo que es necesario realizar procedimientos de aislamiento e identificación de microorganismos.

En la presente investigación se aislarán, a partir de los efluentes de la extractora, los potenciales microorganismos degradadores de carga orgánica contaminante presente en la misma, y una vez identificados, se determinará por medio de una dosificación, el mayor porcentaje de biorremediación alcanzado en el residual.

OBJETIVOS

Objetivo General

“Aislar e identificar cepas microbianas que puedan usarse como potenciales agentes de biorremediación en efluentes de una extractora de aceite de Palma”

Objetivos Específicos:

- Realizar la caracterización físico y química del agua residual proveniente del proceso de extracción del aceite de Palma Africana.
- Aislar e identificar las cepas microbianas más significativas presentes en las descargas de aguas residuales de una empresa extractora de aceite de palma africana.
- Determinar la dosificación óptima de microorganismos.
- Evaluar el porcentaje de biorremediación alcanzado en los ensayos realizados.

CAPÍTULO 1

1 MARCO TEÓRICO

1.1 PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE PALMA AFRICANA

El proceso de producción consiste en la extracción mecánica de aceite rojo del fruto de la palma africana, por mecanismos netamente físicos: prensado, decantación y almacenamiento temporal en tanques.

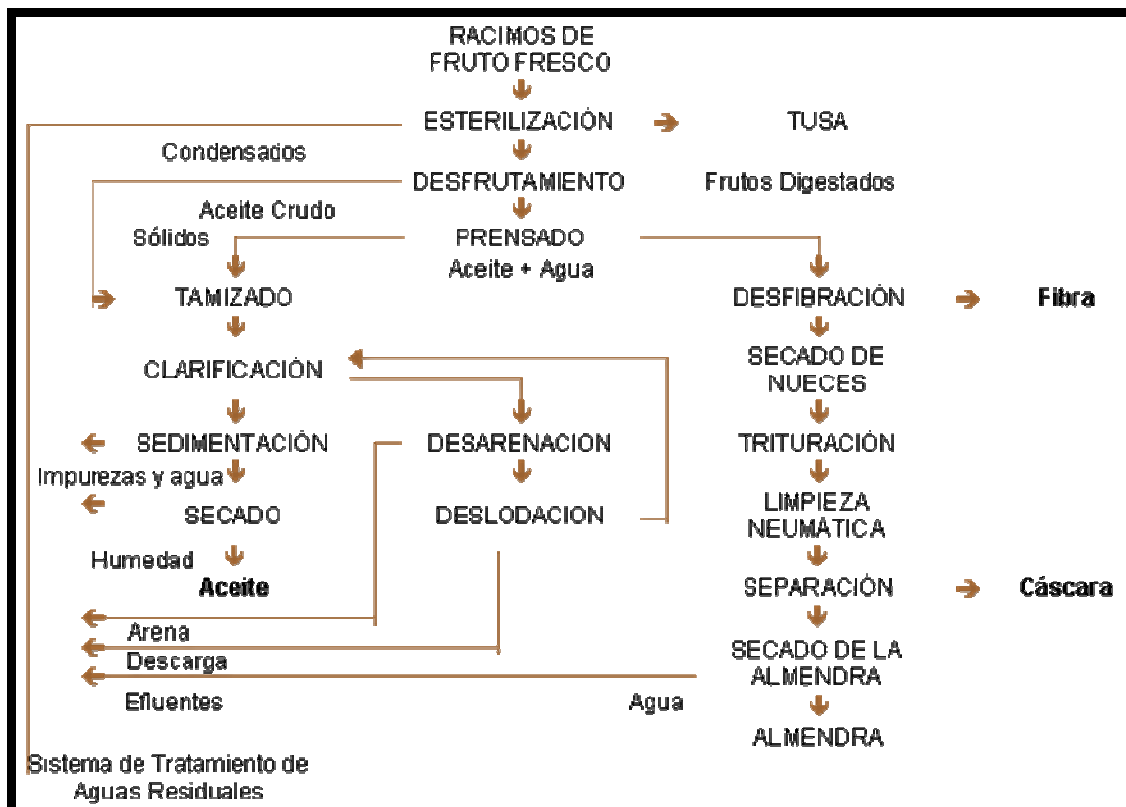


GRÁFICO 1. PROCESO DE EXTRACCIÓN

1.1.1 LA ESTERILIZACIÓN.

Una vez los racimos de palma alcanzan su estado óptimo de madurez, se inicia un proceso bioquímico de descomposición del aceite, formando ácidos grasos libres. Este proceso se conoce comúnmente como acidificación y se acelera una vez los racimos han sido cortados de la palma. Igualmente, con el proceso de maduración, los frutos se desprenden del racimo de manera natural. La textura del mesocarpio en los frutos es muy fibrosa y el aceite contenido en el mismo tiene una viscosidad alta. Con la esterilización se busca detener el proceso de acidificación, acelerar el proceso natural de desprendimiento de los frutos y facilitar la extracción del aceite ablandando los tejidos de la pulpa, entre otros objetivos.

Proceso de Esterilización.

Es la primera etapa y seguramente, la más importante del proceso de extracción de aceite de palma. Consiste en someter el fruto a la acción del vapor para cumplir con objetivos básicos:

- Inactivar la lipasa
- Facilitar el desprendimiento de los frutos del raquis, ablandando la unión entre ellos.
- Ablandar los tejidos de la pulpa.
- Calentar y deshidratar parcialmente las almendras contenidas en las nueces para facilitar su posterior recuperación
- Coagular las proteínas
- Hidrólisis y descomposición del material mucilaginoso (gomas)

1.1.2 DESFRUTACIÓN.

El segundo proceso al cual son sometidos los racimos frescos de palma, una vez han sido esterilizados, es el de la desfrutación. Ésta tiene como objetivo la separación de los racimos esterilizados en frutos sueltos y raquis. Los frutos separados pasan a la siguiente etapa del proceso, mientras que los racimos vacíos o raquis son transportados a través de una banda y recolectados en volquetas para ser aplicados luego en el campo, como abono orgánico. Este proceso se efectúa en un desfrutador de tambor rotatorio, en el cual los racimos van girando dentro del tambor y al llegar a la parte superior caen y se golpean, desprendiendo los frutos.

1.1.3 LA DIGESTIÓN

La pulpa, también llamada mesocarpio, tiene un espesor que varía entre 4 y 8 mm de acuerdo con la variedad de fruto; posee una corteza externa que la cubre y está conformada por un gran número de celdas minúsculas. Estas celdas son de forma irregular, contienen aceite y están pegadas entre sí, por medio de un cemento intercelular (una especie de almidón) y a un esqueleto de fibras duras.

Este cemento es soluble sólo en agua muy caliente (95 – 100°C) y por lo tanto, el conjunto se puede desintegrar en grupos de celdas de aceite y material fibroso en la medida en que el cemento se disuelva. El aceite calentado en el digestor reduce considerablemente su viscosidad y así se facilita su extracción (en esa forma tiene mayor circulación a través de los pequeños espacios llamados capilares) dentro de la torta en proceso de prensado.

Para reducir la cantidad residual de aceite en las fibras, se acostumbra agregar agua a la masa de frutos digerida en la descarga del digestor. Ésta actuará como un medio hidráulico para ayudar a empujar el aceite dentro de los espacios que quedan en el material que se está prensando. Dicha agua no debe agregarse al digestor mismo por el riesgo que se corre de que ella se emulsifique con el aceite, aumentando las pérdidas en las aguas lodosas de desecho. Se agrega el bajante de la prensa después de la caja de separación de aceite “virgen” (aquel que se ha separado dentro del digestor antes de la presión).

Por la acción agitadora y de maceración del digestor, las paredes de las celdas que contienen el aceite tienden a romperse, de tal manera que, el aceite se suelta espontáneamente y puede ser fácilmente expulsado fuera de las celdas rotas durante el proceso de extracción por presión.

1.1.4 PRENSADO.

Con la etapa de prensado se busca extraer la fracción líquida de la masa de frutos que sale del digestor y que está compuesta por aceite de pulpa de palma, por agua y por una cierta cantidad de sólidos que quedan en suspensión en el agua. La masa desaceitada (torta) la cual está compuesta por fibra y nueces, pasa al proceso de desfibración.

Este proceso se efectúa en prensas de tornillos sinfín continuas, las cuales están compuestas por una canasta perforada horizontal de forma cilíndrica doble y por dos tornillos del tipo de sinfín. Los frutos digeridos son prensados dentro de la canasta por acción de dos tornillos sinfín de paso regresivo, girando paralelamente en sentido contrario.

La eficiencia de la etapa de prensado se debe medir según las pérdidas de aceite en las fibras y el contenido de nueces rotas en la torta, teniendo en cuenta la presión (ajuste de los conos), la composición del fruto (% de pulpa / % de nueces) y el espesor del cuesco (cáscara que cubre la almendra).

1.1.5 LA CLARIFICACIÓN.

La clarificación es el proceso mediante el cual se separa y purifica el aceite de la mezcla líquida extraída en las prensas, la cual contiene aceite, agua, lodos livianos (compuestos por pectinas y gomas) y lodos pesados (compuestos por tierra, arena y otras impurezas). Para lograr dicha separación, se aprovecha la característica de inmiscibilidad entre el agua y el aceite.

El proceso de clarificación se divide en dos partes:

- a) **Clarificación estática** (por decantación): en esta etapa se logra separar el 90% del aceite aproximadamente.
- b) **Clarificación dinámica** (por centrifugación): en esta etapa se requiere movimiento por fuerza centrífuga para obtener la separación, con una recuperación de alrededor del 10% de aceite.

1.2 SISTEMA DE TRATAMIENTO DEL EFLUENTE DE PROCESO.

El efluente es un líquido aceitoso con materia orgánica y partículas sólidas, totalmente degradable que no lleva sustancias contaminantes peligrosas como hidrocarburos o químicos ya que éstos son generados en los procesos físicos de esterilización que representa el 12% del peso total de la fruta, en clarificación con un promedio de 0.82 m^3 por tonelada de fruta procesada y también aporta efluentes las purgas de la caldera.



GRÁFICO 2. LAGUNAS DE OXIDACIÓN

1.2.1 TRATAMIENTOS PRELIMINARES.

Ciertos tratamientos como el paso de las aguas residuales a través de los llamados “tanques florentinos” sirven para remover, en lo posible, materiales sedimentables tales como arenas y trozos de frutos, de manera de evitar el desgaste de tuberías y bombas. De igual manera sirve para recuperar aceite que puede retornarse al proceso.

1.2.2 POZOS FLORENTINOS.

Los tanques florentinos permiten que el aceite (menos denso que el agua) se ubique en la parte superior de los tanques, lo que facilita su recuperación por medio de rebose en canaletas o tubos recolectores que lo llevan a un tanque de bombeo para ser retornado al proceso. En estos tanques también se presenta la sedimentación de sólidos pesados, por lo cual es necesaria la evacuación y limpieza de lodos periódicamente.

1.2.3 LAGUNA DE DESACEITADO, ENFRIAMIENTO Y ECUALIZACIÓN DE CAUDALES.

El enfriamiento es importante para garantizar un trabajo óptimo de la población de microorganismos que actuará en la siguiente laguna, ya que éstos requieren temperaturas menores de 37 °C. En algunos sistemas de lagunas, la labor de enfriamiento se realiza con la ayuda de equipos, como son las torres de enfriamiento.

La recuperación del aceite ácido se hace por decantación hacia la superficie y retiro posterior, manualmente. Este aceite se puede vender como materia prima para la jabonería.

La materia orgánica de los efluentes varía durante el día y a través de la semana, por lo cual esta laguna cumple con la función de darle al flujo de líquido menores fluctuaciones comparativamente con una descarga directa. El diseño del tamaño de la laguna de desaceitado y enfriamiento se basa en el tiempo de retención hidráulica. Se usan tiempos entre 2 y 3 días.

Para que el sistema de lagunas funcione adecuadamente, la carga orgánica inicial debe ser regulada mediante dilución con agua superficial. En periodo seco la evaporación, en la superficie de las lagunas, es muy fuerte y si esta situación no se controla puede ocasionar problemas de concentración de las aguas lodosas y por lo tanto de la carga orgánica. Para compensar el agua perdida por evaporación es necesario realizar una recirculación del efluente final, lo cual contribuye además con alcalinidad que neutraliza parte de la acidez de las aguas.

1.2.4 LAGUNAS ANAEROBIAS.

Las lagunas anaerobias son lagunas de tratamiento biológico donde la digestión del material orgánico es realizada por la acción metabólica de bacterias anaerobias. La digestión se realiza en dos etapas: inicialmente un grupo de bacterias descompone las moléculas orgánicas en ácidos orgánicos, y óxido de carbono, amoníaco y materia celular.

Luego, un segundo grupo de bacterias, en condiciones favorables de pH y temperatura transforman los ácidos orgánicos en metano, dióxido de carbono y materia celular. En aquellos casos, en los cuales la concentración de ácidos orgánicos, es tal que el pH es menor a 6.5, no es posible cumplir con la etapa metanogénica y en cambio se produce gran cantidad de ácido sulfhídrico, malos olores y deficiencia en el funcionamiento del sistema.

Para que los microorganismos mantengan una actividad metabólica adecuada, el rango de pH óptimo se encuentra entre 6.5 y 7.5. Las aguas residuales del proceso de extracción de aceite son de naturaleza ácida (pH alrededor de 4), por lo cual es importante la recirculación mencionada anteriormente.

Las lagunas anaerobias se diseñan para tratar cargas orgánicas altas. Allí ocurre básicamente lo siguiente:

- La mayoría de los sólidos en suspensión se sedimentan.
- Las materias flotantes (grasas, natas, espumas y sólidos ligeros) salen a la superficie.
- Parte de la materia orgánica es digerida por acción de las bacterias anaerobias y ocurren fenómenos de descomposición.
- Se remueve la gran mayoría del DBO₅, DQO y ST (entre 80 y 90 %)

Periódicamente es necesaria la evacuación de lodos de estas lagunas para evitar que se colmaten de sólidos y salgan de servicio. Las lagunas anaerobias remueven alrededor del 85 % del DQO y se diseñan para una COV (carga orgánica volumétrica) de máximo 5 Kg de DQO / m³ x día.

1.2.5 LAGUNAS FACULTATIVAS.

El efluente de las lagunas anaerobias pasa a un sistema de lagunas facultativas, que consta de dos lagunas en serie con posibilidad de instalación de otras unidades. La función principal de estas es la remoción de la carga orgánica que escapó al tratamiento en la laguna anaerobia. Las lagunas facultativas son un sistema de tratamiento biológico natural con una variedad de procesos involucrados, incluyendo oxidación, sedimentación, hidrólisis, fotosíntesis nitrificación, digestión anaerobia, transferencia de oxígeno, etc.

Las lagunas se caracterizan por tener dos estratos diferentes. La capa superior que es aerobia y la del fondo que es anaerobia y además existe una capa intermedia de características facultativas (mixta).

La acción de la luz solar, el viento, la temperatura, el fenómeno de fotosíntesis y el crecimiento bacterial son de mucha importancia para su buen funcionamiento. La digestión de la materia orgánica se produce principalmente por la acción combinada entre algas y bacterias. Hay un crecimiento de algas por acción de la fotosíntesis y la presencia de nutrientes. Las algas producen O_2 y aprovechan el CO_2 liberado por la actividad bacterial. Las bacterias aprovechan el oxígeno y degradan la materia orgánica desdoblándola y como producto de su trabajo producen CO_2 que es aprovechado por las algas.

Las lagunas facultativas remueven alrededor del 75 % del DQO que quedó después de las lagunas anaerobias y se diseñan para una COS (carga orgánica superficial) de $0.35 \text{ Kg de DQO} / \text{m}^2 \times \text{día}$.

1.2.6 CONTROL DEL SISTEMA DE LAGUNAS DE OXIDACIÓN.

Para controlar el comportamiento de las lagunas de oxidación, es necesario entonces, cuantificar en el laboratorio principalmente ciertos parámetros de importancia tales como:

- Demanda Química de Oxígeno (DQO)
- Ácidos Grasos Volátiles (AGV)
- Potencial de hidrógeno (pH)
- Temperatura (T)

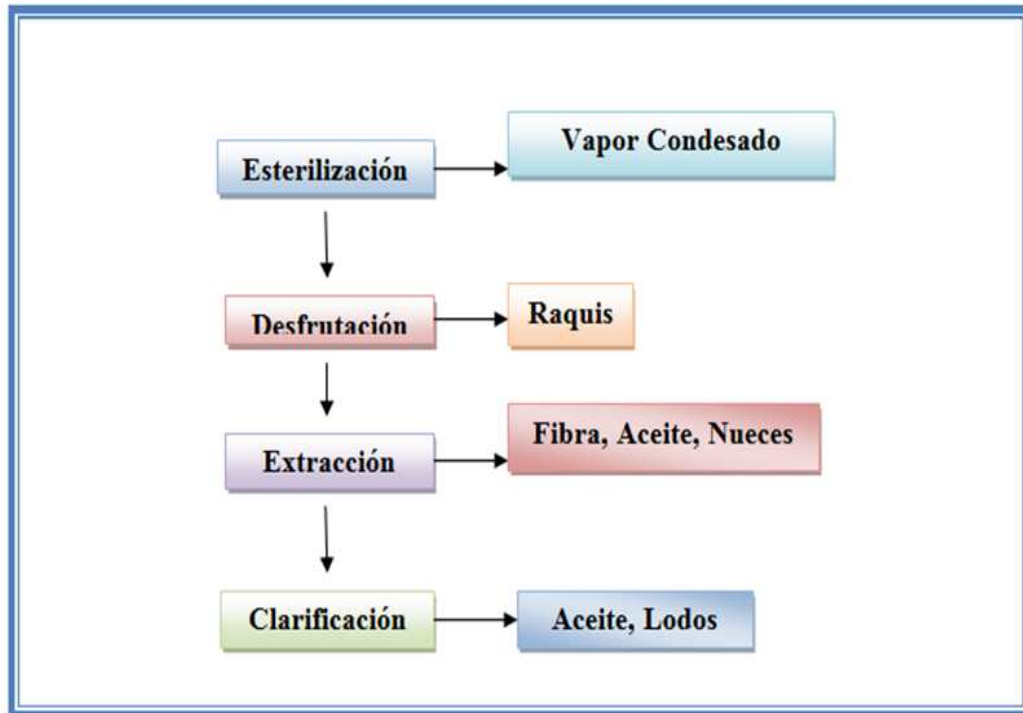


GRÁFICO 3. ESQUEMA DE LOS SUBPRODUCTOS Y RESIDUOS DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN.

Durante el proceso de extracción de aceite de Palma aceitera se generan varios subproductos los mismos que causan un gran impacto al ambiente, entre éstos tenemos los efluentes que pueden ser aprovechados mediante procesos biotecnológicos.

En la actualidad se realizan aislamientos de microorganismos para usarlos en diferentes procesos como biorremediación, biosíntesis de enzimas, producción de biofertilizantes, biosurfactantes entre otros, que se han desarrollado para disminuir el impacto ocasionado al ambiente en los diferentes procesos industriales.

1.3 SIEMBRA Y AISLAMIENTO

1.3.1 SIEMBRA.



GRÁFICO 4. SIEMBRA MICROBIOLÓGICA

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Luego de sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento.

La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido, utilizando punta, asa, hisopo o pipeta estéril.

1.3.1.1 Cultivo en medio líquido.

Habitualmente se realiza en tubos o en matraces. El crecimiento se puede manifestar por enturbiamiento, por formación de velo o película, o por sedimento.



GRÁFICO 5. CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO

1.3.1.2 Cultivo en medio sólido.

Puede ser en tubos o placas.

- Tubos con agar inclinado. Para sembrarlos, se mueve el asa o la punta suavemente sobre la superficie del agar con un movimiento en zigzag desde el fondo hasta la parte superior, cuidando de no dañar el agar.
- Tubos sin inclinar. Se siembran introduciendo una punta en el centro del agar, También se llama siembra por picadura.
- Siembra en placas. Puede ser en superficie o incorporada.



GRÁFICO 6. CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO

En medio sólido cada célula viable dará origen a una colonia y por lo tanto la siembra en placas se puede utilizar, no sólo para cultivar microorganismos, sino además para contar y aislar.

En general cuando se quiere tener colonias aisladas a partir de un material determinado, es necesario diluir la muestra en tubos con suero fisiológico estéril.

1.3.2 AISLAMIENTO.

Es separar un tipo de microorganismo a partir de una población que los contiene de varios tipos. En hábitats naturales, raramente encontramos a los microorganismos en cultivo puro (un solo tipo de microorganismo), por lo tanto es necesario hacer algún procedimiento de aislamiento para separar e identificar los distintos tipos de microorganismos presentes.

El aislamiento se puede lograr directamente a partir de una muestra cuando él o los microorganismos están en una proporción adecuada.

Cuando el microorganismo que se desea aislar e identificar se encuentra en baja proporción en la muestra, o interesa un solo tipo de microorganismo, se lleva a cabo un procedimiento llamado búsqueda que involucra una primera etapa de aumento del número de microorganismos del tipo que se desea aislar en relación al resto de la población. Luego se aísla por el método de estrías o por dilución y se identifica.

Para aislar se utiliza los siguientes procedimientos:

- a) aislamiento por estrías
- b) aislamiento por dilución



GRÁFICO 7. AISLAMIENTO POR ESTRÍAS Y POR DILUCIÓN

1.3.2.1 Aislamiento en placa por estrías.

Existen distintas técnicas, el objeto es obtener colonias aisladas.

Técnica a.

Consiste en cargar el asa con la muestra y hacer estrías paralelas en la cuarta parte de la superficie de la placa; se quema el asa, se enfría, se gira la placa 90° y se vuelve a estriar tocando 3 o 4 veces el área sembrada inicialmente y cubriendo otro cuarto de placa. Por último, sin quemar el asa, se estría el resto de la superficie sin sembrar.

Técnica b.

Con el asa cargada se hacen 3 o 4 estrías; se quema el asa, se hacen 3 o 4 estrías perpendiculares a las anteriores, se quema el asa y se repite el procedimiento hasta agotar la superficie de la placa.

1.3.2.2 Aislamiento por dilución en medio sólido.

Se emplean tanto el método de siembra incorporada como el de siembra en superficie.

Suele ser necesario diluir la muestra. Para ello se puede preparar las diluciones decimales en condiciones asépticas usando suero fisiológico o algún otro diluyente.

La siembra incorporada se realiza como se describió anteriormente. También se pueden preparar las diluciones directamente en tubos de agar fundido y termostatizado (20 mL) se agita por rotación entre las manos y se vierte en placas de Petri estériles.

1.3.2.3 Aislamiento de Microorganismos Anaerobios.

Para aislar microorganismos anaerobios que son rápidamente destruidos por exposición al oxígeno, las placas pueden ser preparadas en la forma usual, y luego de sembradas, incubadas en recipientes cerrados en atmósfera sin oxígeno.

También se puede sembrar diluciones en tubos con agar fundido y termostatzado que luego se tapan con una capa de vaselina-parafina, para evitar el acceso de aire.

Con anaerobios más sensibles al oxígeno, se trabaja en cámaras anaerobicas, o también usando la técnica del "roll-tube", que es un tubo en el que el agar se deposita en las paredes al hacerlo girar mientras se enfría; se trabaja gaseando el tubo continuamente con gas libre de O₂ mientras el tubo está destapado.

1.3.2.4 Cultivo Puro.

A partir de colonias aisladas en medio no selectivo se realiza un examen microscópico que debe mostrar células razonablemente semejantes respecto al Gram y a la morfología.

Las colonias deben describirse por examen macroscópico en función del tamaño, la forma, el borde, la elevación, la transparencia y el color. Esto resulta a veces muy útil en la identificación.

En las aguas residuales podemos encontrar diferentes tipos de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos entre otros, que pueden ser aislados para usarse en la degradación de la carga orgánica presentes en las mismas.

1.4 MICROORGANISMOS PRESENTES EN AGUAS RESIDUALES

1.4.1 BACTERIAS.

Constituyen el principal componente. Los géneros principales son *Zooglea*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Corynebacterium* y *Acinetobacter*; también hay formas filamentosas como *Beggiatoa*. Estas bacterias oxidan la materia orgánica y producen polisacáridos y otros polímeros extracelulares que facilitan la floculación. Los microorganismos aerobios representan una fracción importante cuyo número varía inversamente al tamaño del flóculo puesto que la difusión de O₂ al interior se va viendo más dificultada. En los flóculos de gran tamaño el interior es anaerobio y permite el crecimiento de anaerobios estrictos (tales como metanógenos) que han sobrevivido fases de mayor aerobiosis en pequeñas bolsas anaerobias internas en flóculos de menor tamaño.

1.4.2 HONGOS.

Normalmente no están presentes. Sólo en condiciones ambientales muy especiales (bajo pH, deficiencia de nitrógeno, presencia de productos tóxicos) pueden aparecer ciertos hongos de los géneros *Penicillium* y *Cephalosporium*, entre otros.

1.4.3 PROTOZOOS.

Están presentes como depredadores de las bacterias. Pertenecen a los tres grupos (ciliados, flagelados y rizópodos). La actividad de los protozoos contribuye significativamente a la reducción de la DBO. Los principales microorganismos eucariotas presentes en los fangos activos son los protozoos ciliados libres (*Paramecium*), fijos (*Vorticella*) o reptantes

(*Aspidisca*, *Euplotes*), los cuales se encuentran en altas densidades y desempeñan un importante papel en el proceso de depuración y en la regulación del resto de la comunidad biótica. Mejoran la calidad del efluente y regulan la biomasa bacteriana al preñar sobre las bacterias dispersas del licor de mezcla. Otros protozoos presentes son los flagelados *Bodo* o *Pleuromonas* y, dentro del grupo sarcodina, el género *Amoeba*.

1.4.4 METAZOOS.

Aunque pueden estar presentes en las balsas de activación organismos multicelulares tales como **Nemátodos**, **Anélidos**, **Crustáceos** o **Ácaros**, los organismos multicelulares más comunes son los **Rotíferos** (*Lecane*, *Philodina* o *Notommata*). Eliminan bacterias libres y posibles patógenas (Salmonelas, bacterias fecales, etc.) y producen un mucus que mantienen el flóculo junto con el exopolisacárido producido por la bacteria *Zooglea ramigera*.

1.4.5 ALGAS MICROSCÓPICAS.

Si bien no suelen formar parte del flóculo, pueden aparecer en aquellas aguas residuales con gran cantidad de materia orgánica. Entre las más comunes se encuentran *Cosmarium* y *Pediastrum* (chlorophyta); *Euglena* (Euglenophyta) y *Pinnularia* (Chrysophyta).

CAPÍTULO 2

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MUESTREO.

Se lo realizó con la colaboración de la extractora de Aceite Palcien. S.A. en la ciudad de Quinindé, provincia de Esmeraldas; se tomó la muestra en varios puntos de la laguna #2 del sistema de tratamiento de las aguas residuales de la respectiva empresa.

2.2 METODOLOGÍA.

2.2.1 MÉTODOS Y TÉCNICAS.

2.2.1.1 Métodos.

Se realizó la caracterización del residual con análisis de temperatura, pH, sólidos totales, aceites y grasa, DBO, DQO.

2.2.1.1.1 Temperatura: Determinación directa.

2.2.1.1.2 pH: Determinación potenciométrica. El principio básico de la medida electrométrica del pH se fundamenta en el registro potenciométrico de la actividad de los iones hidrógeno por el uso de un electrodo de vidrio y un electrodo de referencia, o un electrodo combinado. El pH es la medida de la concentración de iones de hidrógeno $[H^+]$, o en su defecto de los iones hidroxilo $[OH^-]$, en el agua. Cuando proliferan los iones de hidrógeno el valor del pH se ubica entre 0 y 7, y se dice que es ácido, por otra parte cuando los hidroxilo son los que abundan, el valor del pH se sitúa entre 7 y 14, y se dice que el agua es básica o alcalina

2.2.1.1.3 DQO: La prueba de demanda química de oxígeno indica la cantidad de compuestos oxidables que se tienen en el agua. La demanda química de oxígeno (DQO) determina la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica en una muestra de agua residual, bajo condiciones específicas de agente oxidante, temperatura y tiempo.

Las sustancias orgánicas e inorgánicas oxidables presentes en la muestra, se oxidan mediante reflujo en solución fuertemente ácida (H_2SO_4) con un exceso conocido de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en presencia de sulfato de plata ($AgSO_4$) que actúa como agente catalizador, y de sulfato mercurico ($HgSO_4$) adicionado para remover la interferencia de los cloruros. Después de la digestión, el remanente de $K_2Cr_2O_7$ sin reducir se titula con sulfato ferroso de amonio; se usa como indicador de punto final el complejo ferroso de ortofenantrolina (ferroina). La materia orgánica oxidable se calcula en términos de oxígeno equivalente.

El método es aplicable a muestras de aguas residuales domésticas e industriales que tengan DBO superiores a 50 mg O_2/L . Para concentraciones más bajas, tales como muestras de aguas superficiales, se puede usar el método modificado para

bajo nivel en un intervalo entre 5 y 50 mg O₂/L. Cuando la concentración de cloruro en la muestra es mayor de 2 000 mg/L, se requiere el método modificado para las aguas salinas.

2.2.1.1.4 Sólidos Totales: Determinación gravimétrica. La muestra es evaporada en el microondas según la técnica establecida en las extractoras de aceite de palma africana. Se evapora una muestra correctamente mezclada en una placa pesada y secada. El aumento de peso sobre el de la placa vacía representa los sólidos totales. Es posible que en muestras de aguas residuales los resultados no representen el peso real de los sólidos disueltos y suspendidos.

2.2.1.1.5 Aceites y Grasas: Extracción Soxhlet. La extracción se realiza con éter a partir de la muestra seca que se usa para determinar sólidos totales.

Aceites y Grasas pueden influir en los sistemas de tratamientos de aguas residuales si se presentan en cantidades excesivas, pueden interferir con los procesos biológicos aerobios y anaerobios reduciendo la eficiencia del tratamiento de efluentes. Cuando las aguas residuales o efluentes tratados, que poseen estas sustancias, son volcados a los cursos de aguas naturales, pueden crear películas de superficie y depósitos en las orillas que llevan a la degradación del ambiente.

2.2.1.1.6 Aislamiento: Técnica de siembra por estrías en placa, Técnica de las diluciones en serie. Los elementos importantes para el estudio de los microorganismos, consiste en aislarlos y purificarlos a partir del tejido y/o material en estudio. Para llevar a cabo este proceso existen diferentes metodologías y la elección de cualquiera de ellas dependerá del tipo de tejido, sea este animal o vegetal y del equipo disponible en el laboratorio.

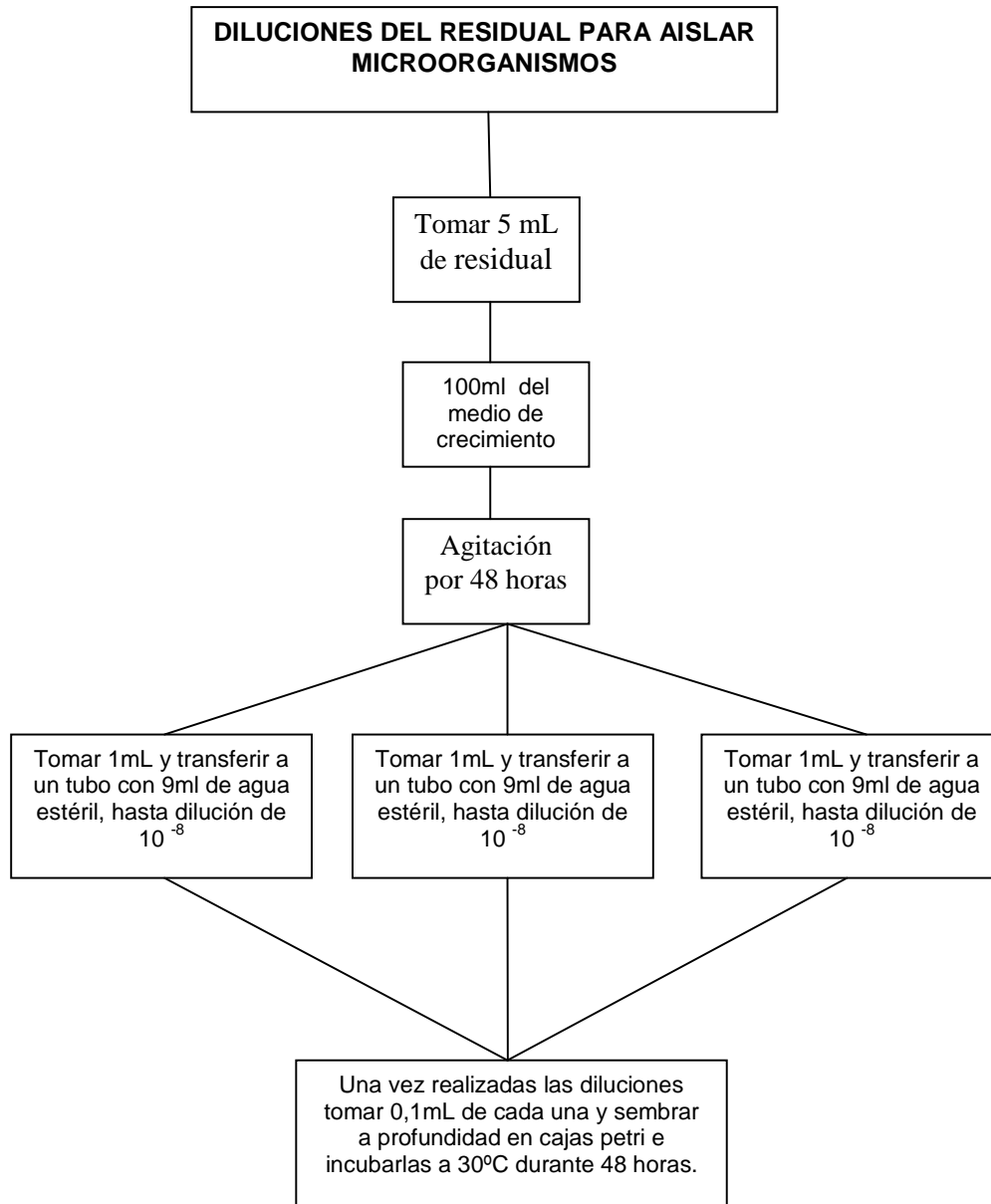


GRÁFICO 8. DIAGRAMA DE DILUCIONES

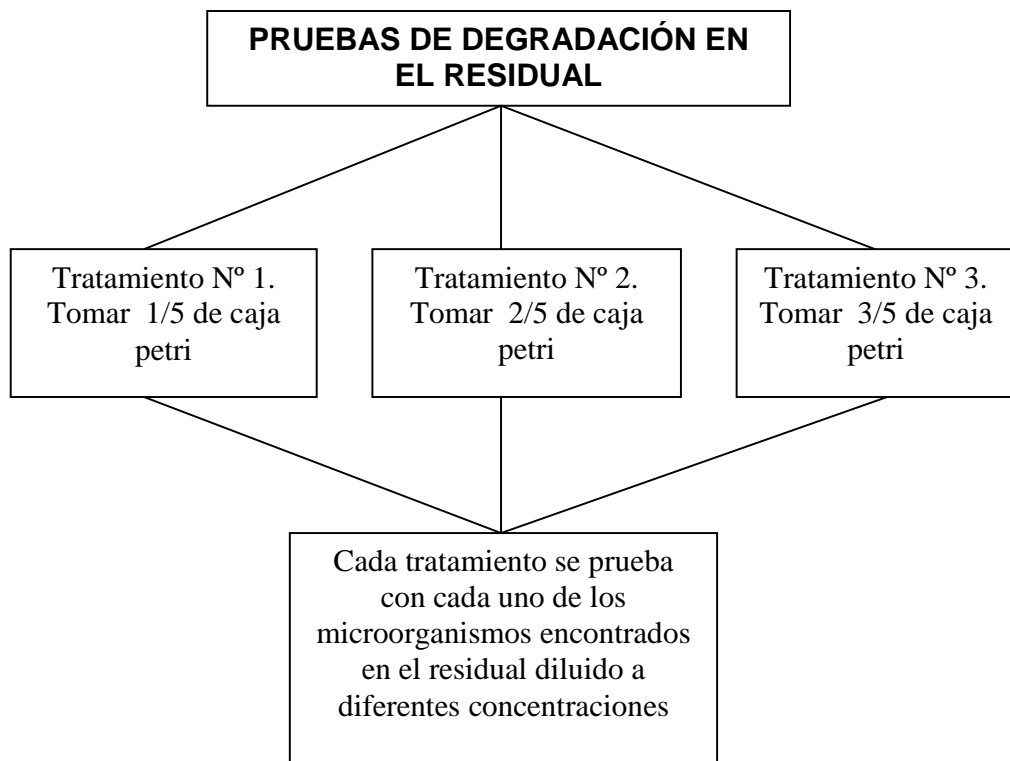


GRÁFICO 9. DIAGRAMA DE LAS PRUEBAS DE DEGRADACIÓN

2.2.1.2 Técnicas

2.2.1.2.1 Temperatura (APHA-AWWA-WPCF 2250 B. Ver Anexo 1.)

2.2.1.2.2 pH (APHA-AWWA-WPCF 4500-H⁺ B. Ver Anexo 2.)

2.2.1.2.3 Sólidos Totales (APHA-AWWA-WPCF 2540-C Ver Anexo 3.)

2.2.1.2.4 Aceites y Grasas (APHA-AWWA-WPCF 5520 D. Ver Anexo 4.)

2.2.1.2.5 DQO (APHA-AWWA-WPCF 5220 D. Ver Anexo 5.)

2.2.1.2.6 Siembra en medio solido (Ver Anexo 6.)

2.2.1.3 MATERIALES Y EQUIPOS

2.2.1.3.1 Materiales

TABLA 1. MATERIALES UTILIZADOS EN EL LABORATORIO.

Cantidad	Material
3	Pipeta de 1mL
3	Pipeta de 5 mL
3	Pipeta de 10 mL
20	Erlenmeyer de 250 mL
2	Erlenmeyer de 1000 mL
3	Probeta de 50 mL
2	Asas con mango
1	Caja de guantes
20	Mangas de caja Petri
1	Pera de 3 vías

6	Balón aforado de 25 mL
1	Balón aforado de 1000 mL
1	Pizeta
5	Vaso de precipitación de 50 mL
3	Cápsula de porcelana

2.2.1.3.2 Reactivos

- Agua destilada.
- Nitrato de sodio.
- Fosfato diácido de potasio.
- Cloruro de potasio.
- Sulfato de magnesio heptahidratado.
- Cloruro de calcio.
- Sulfato ferroso heptahidratado.
- Ácido bórico.
- Sulfato cúprico pentahidratado.
- Sulfato manganeso hidratado.
- Molibdato de sodio dihidratado.
- Sulfato de zinc heptahidratado.
- Éter etílico
- Alcohol Industrial
- Agar Macconkey
- Agar PDA
- Agar extracto de Malta

2.2.1.3.3 Equipos.

- Autoclave.
- Cámara de flujo laminar.
- Incubadora.
- Refrigeradora.
- Balanza.

2.3 DATOS EXPERIMENTALES

2.3.1 DIAGNÓSTICO.

La industria de la extracción de aceite de palma en el Ecuador es una de las que más impacto ocasiona al ambiente no sólo por el hecho de ocupar grandes extensiones de tierra para sus cultivos, también por los subproductos que genera durante el proceso de extracción de aceite rojo.

En lo que respecta al sistema de tratamiento de aguas residuales de la industria se manejan lagunas de oxidación las cuales se inoculan con una mezcla de agua residual, lodos y estiércol de ganado no tienen conocimiento exacto de que tipo de microorganismos existen.

El propósito de esta investigación es dar a conocer los microorganismos que se pueden encontrar en el efluente de una extractora de palma aceitera, mediante la siembra y aislamiento de los mismos.

CAPÍTULO 3

3 LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

3.1 CÁLCULOS.

3.1.1 CÁLCULOS EMPLEADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUAL.

3.1.1.1 Sólidos Totales.

Formula:

$$\text{Sólidos totales mg/L:} \quad (W2 - W1) \times 20000$$

La constante 20000 proviene de la multiplicación de los factores de conversión para obtener los resultados en mg/L dividido para el volumen de la muestra.

TABLA 2. CÁLCULO DE SÓLIDOS TOTALES

Réplica	W2	W1	Constante	Sólidos totales (mg/L)
1	162,962	162,226	20000	14720
2	183,131	182,442	20000	13780
3	176,576	175,872	20000	14080

Promedio	14193
-----------------	--------------

3.1.1.2 Aceites y grasas.

Fórmula:

Aceites y grasas mg/L: $(W4 - W3) \times 20000$

La constante 20000 proviene de la multiplicación de los factores de conversión para obtener los resultados en mg/L dividido para el volumen de la muestra.

TABLA 3. CÁLCULO DE ACEITES Y GRASAS.

Réplica	W4	W3	Constante	Aceites y grasas (mg/L)
1	108,61	108,579	20000	620
2	178,958	178,938	20000	400
3	159,105	159,076	20000	580
Promedio				533

3.1.1.3 Temperatura

TABLA 4. TEMPERATURA

Réplica	T
1	38,5
2	38,3
3	38,5
Promedio	38,43

3.1.1.4 pH

TABLA 5. PH

Réplica	pH
1	4,2
2	4,5
3	4,3
Promedio	4,3

3.1.2 CÁLCULOS DE LA DQO EN LAS PRUEBAS DE DEGRADACIÓN.

3.1.2.1 DQO de pruebas de degradación.

Formula

$$\text{D.Q.O (mg/L O}_2\text{): } \frac{(A - B) \times N \times 8000 \times F}{V}$$

TABLA 6. CÁLCULO DQO PRUEBA DE DEGRADACIÓN EN RESIDUAL AL 5%

Microorganismo	Tratamiento	A	B	N	Peso eq. O ₂ * 1000	F	V	D.Q.O (mg/L O ₂):
Aspergillus	1	6,4	6,2	0,25	8000	100	10	4000
	2	6,4	6,25	0,25	8000	100	10	3000
	3	6,4	6,3	0,25	8000	100	10	2000

	1	6,4	6,35	0,25	8000	100	10	1000
Brevundimonas	2	6,4	6,37	0,25	8000	100	10	600
	3	6,4	6,38	0,25	8000	100	10	400

TABLA 7. CÁLCULO DQO PRUEBA DE DEGRADACIÓN EN RESIDUAL AL 25%

Microorganismo	Tratamiento	A	B	N	Peso eq. O ₂ * 1000	F	V	D.Q.O (mg/L O ₂):
Concentración al 25%		5,4	5,2	0,25	8000	100	10	4000
Brevundimonas diminuta	1	5,4	5,3	0,25	8000	100	10	2000
	2	5,4	5,35	0,25	8000	100	10	1000
	3	5,4	5,36	0,25	8000	100	10	800
Aspergillus fumigatus	1	5,4	5,1	0,25	8000	100	10	6000
	2	5,4	5,2	0,25	8000	100	10	4000
	3	5,4	5,29	0,25	8000	100	10	2200
Fusarium avenaceum	1	5,4	5,15	0,25	8000	100	10	5000
	2	5,4	5,1	0,25	8000	100	10	6000
	3	5,4	5,28	0,25	8000	100	10	2400
Fusarium solani	1	5,4	5	0,25	8000	100	10	8000
	2	5,4	5,19	0,25	8000	100	10	4200
	3	5,4	5,25	0,25	8000	100	10	3000

TABLA 8. CÁLCULO DQO PRUEBA DE DEGRADACIÓN EN RESIDUAL AL 50%

Microorganismo	Tratamiento	A	B	N	Peso eq. O ₂ * 1000	F	V	D.Q.O (mg/L O ₂):
Concentración al 50%		5,4	5,19	0,25	8000	200	10	8400
Brevundimonas diminuta	1	5,4	5,2	0,25	8000	200	10	8000
	2	5,4	5,3	0,25	8000	200	10	4000
	3	5,4	5,36	0,25	8000	200	10	1600
Aspergillus fumigatus	1	5,4	4,9	0,25	8000	200	10	20000
	2	5,4	5	0,25	8000	200	10	16000
	3	5,4	5,25	0,25	8000	200	10	6000
Fusarium avenaceum	1	5,4	5,15	0,25	8000	200	10	10000
	2	5,4	4,95	0,25	8000	200	10	18000
	3	5,4	5,24	0,25	8000	200	10	6400
Fusarium solani	1	5,4	4,95	0,25	8000	200	10	18000
	2	5,4	4,9	0,25	8000	200	10	20000
	3	5,4	5,21	0,25	8000	200	10	7600

3.2 RESULTADOS.

Los resultados que se reportan son los obtenidos en la ejecución de la tesis y los realizados por laboratorios especializados.

3.2.1 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUAL.

TABLA 9. CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUAL

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO
Temperatura	°C	38.4
pH		4.06
Sólidos Totales	mg/L	14.166
Aceites y Grasas	mg/L	533
*Demanda Química de Oxígeno	mg/L	20.000

3.2.2 RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.

La identificación de los microorganismos aislados se realizó en OSP, Facultad de Ciencias Químicas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Central del Ecuador.

Se aislaron 3 cepas de hongos y 1 bacteria de los cuales el hongo HA es *Aspergillus fumigatus*, hongo HB4 = *Fusarium avenaceum*, hongo HB = *Fusarium Solani*, y la bacteria corresponde a *Brevundimonas diminuta*. (Ver anexos 7, 8, 9 y 10.)

3.2.3 PRUEBA DE DEGRADACIÓN CON LOS DIFERENTES MICROORGANISMOS.

TABLA 10. PRUEBAS DE DEGRADACIÓN CONCENTRACIÓN AL 5%.

MICROORGANISMO	TRATAMIENTO	*DQO	DQO
		INICIAL (mg/L)	FINAL (mg/L)
<i>*Fusarium avenaceum</i>	1	2.240	7.200
	2	2.240	12.160
	3	2.240	1.920
<i>*Fusarium solani</i>	1	2.240	6.720
	2	2.240	14.560
	3	2.240	14.880
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	2.240	4.000
	2	2.240	3.000
	3	2.240	2.000
<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	2.240	1.000
	2	2.240	600
	3	2.240	400

***Fuente: Laboratorio de Análisis Técnicos Facultad de Ciencias**

TABLA 11. PRUEBAS DE DEGRADACIÓN CONCENTRACIÓN AL 25%.

MICROORGANISMO	TRATAMIENTO	DQO INICIAL (mg/L)	DQO FINAL (mg/L)
<i>Fusarium avenaceum</i>	1	4000	5.000
	2	4000	6.000
	3	4000	2.400
<i>Fusarium solani</i>	1	4000	8.000
	2	4000	4.200
	3	4000	3.000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	4000	6.000
	2	4000	4.000
	3	4000	2.200
<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	4000	2.000
	2	4000	1000
	3	4000	800

***Fuente: Propia**

TABLA 12. PRUEBAS DE DEGRADACIÓN CONCENTRACIÓN AL 50%.

MICROORGANISMO	TRATAMIENTO	DQO INICIAL (mg/L)	DQO FINAL (mg/L)
<i>Fusarium avenaceum</i>	1	8400	10.000
	2	8400	18.000
	3	8400	6.400
<i>Fusarium solani</i>	1	8400	18.000
	2	8400	20.000
	3	8400	7.600
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	8400	20.000
	2	8400	16.000
	3	8400	6.000
<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	8400	8.000
	2	8400	4000
	3	8400	1600

*Fuente: Propia

TABLA 13. PORCENTAJES DE REMOCIÓN DE CARGA ORGÁNICA CON *BREVUNDIMONAS*

CONCENTRACIÓN	TRATAMIENTO	REMOCIÓN (%)
5%	1	55
	2	73
	3	82
25%	1	50
	2	75
	3	80
50%	1	5
	2	52
	3	81

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS PRUEBAS DE DEGRADACIÓN CON LOS DIFERENTES MICROORGANISMOS

TABLA 14. DENOMINACIÓN DE FACTORES.

FACTORES					
MICROORGANISMOS		TRATAMIENTOS		CONCENTRACIÓN	
<i>Fusarium solani</i>	A1	1	B1	5%	C1
<i>Fusarium avenaceum</i>	A2	2	B2	25%	C2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	A3	3	B3	50%	C3
<i>Brevundimonas diminuta</i>	A4				

Donde:

A: microorganismos

B: tratamientos

C: concentración

H_0 : Efecto A = 0

H_1 : Efecto A \neq 0

H_0 : Efecto B = 0

H_1 : Efecto B \neq 0

H_0 : Efecto C = 0

H_1 : Efecto C \neq 0

H_0 : Efecto AB = 0

H_1 : Efecto AB \neq 0

H_0 : Efecto AC = 0

H_1 : Efecto AC \neq 0

H_0 : Efecto BC = 0

H_1 : Efecto BC \neq 0

H_0 : Efecto ABC = 0

H_1 : Efecto ABC \neq 0

Para probar las 7 hipótesis descritas se utiliza el siguiente ANOVA:

TABLA 15. ANOVA

FV	SC	GL	CM	F0	VALOR p
Efecto A	685,115,781.94	3	228,371,927.31	164,427,787.67	1.6853E-128
Efecto B	292,850,802.78	2	146,425,401.39	105,426,289.00	1.5199E-122
Efecto C	747,269,269.44	2	373,634,634.72	269,016,937.00	7.2256E-130
Efecto AB	146,654,363.89	6	24,442,393.98	17,598,523.67	7.3604E-115
Efecto AC	224,308,963.89	6	37,384,827.31	26,917,075.67	3.5073E-118
Efecto BC	210,531,005.56	4	52,632,751.39	37,895,581.00	1.0978E-118
Afecto ABC	173,427,327.78	12	14,452,277.31	10,405,639.67	6.3726E-114
Error	50.00	36	1.39		
Total	2,480,157,565.28	71			

El análisis de varianza para probar los siete efectos: A, B, C, AB, AC, BC y ABC se muestra en la tabla de ANOVA de la misma se concluye que los 7 efectos debes ser interpretados, ninguno se puede desechar enviándolos como error puesto que los valores p de cada efecto son estadísticamente significantes, es decir están activos. Como se puede observar los valores p son menores que el nivel de significancia de 0.05.

Con un nivel de confianza de 95% se rechazan las 7 hipótesis nulas y se puede decir que los efectos de los factores son distintos de cero.

3.3.1 DIAGRAMA DE CAJAS SIMULTÁNEOS Y TESTS DE RANGOS MULTIPLES

El diagrama de caja es otra herramienta para describir el comportamiento de los datos y de suma utilidad para comparar tratamientos. El diagrama de caja se basa en los cuartiles y parte el rango de variación de los datos en cuatro grupos, cada uno de los cuales contiene 25% de las mediciones de los datos menores y de dónde a dónde se ubica el 50% que están en el centro.

3.3.1.1 Factor A: Microorganismo

TABLA 16. FACTOR A MICROORGANISMOS CON EL MÉTODO LSD

Multiple Range Tests for Var_1 by Factor_A Micoorganismo			

Method: 95,0 percent LSD			
Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups

Brevundimona	18	2155,56	X
Aspergillus	18	7022,22	X
Fusarium	18	7631,11	X
Fusariumsolani	18	10773,3	X

Contrast		Difference	+/- Limits

Aspergillus - Brevundimona		*4866,67	1273,9
Aspergillus - Fusarium		-608,889	1273,9
Aspergillus - Fusariumsolani		*-3751,11	1273,9
Brevundimona - Fusarium		*-5475,56	1273,9
Brevundimona - Fusariumsolani		*-8617,78	1273,9
Fusarium - Fusariumsolani		*-3142,22	1273,9

* denotes a statistically significant difference.			

Bajo el método LSD con un 95% de confianza, se puede afirma que los resultados obtenidos con *Aspergillus* y *Fusarium avenaceum* son grupos homogéneos, y estos son significativamente diferentes de *Brevundimonas diminuta* que siempre logro bajar la carga orgánica en mayor porcentaje lo contrario de *Fusarium solani*.

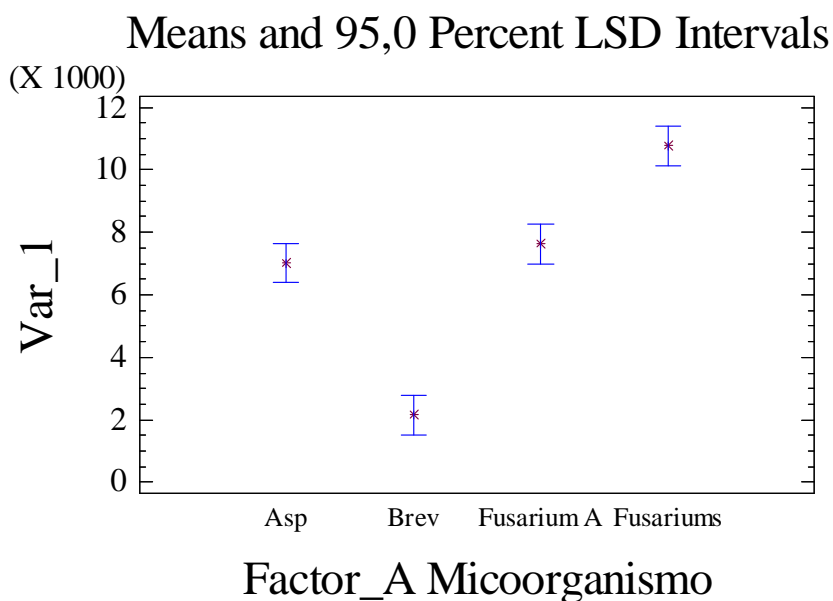


GRAFICO 10. FACTOR A MICROORGANISMOS CON EL MÉTODO LSD

Los intervalos de los 4 microorganismos no se traslapan, y como se puede observar el correspondiente a *Brevundimona* su media es diferente y menor que las medias de los hongos.

3.3.1.2 Factor B: Tratamiento

TABLA 17. FACTOR B TRATAMIENTO CON EL MÉTODO LSD

Multiple Range Tests for Var_1 by Factor_B Tratamiento

Method: 95,0 percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
3	24	4066,67	X
1	24	7993,33	X
2	24	8626,67	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	-633,333	1103,23
1 - 3	*3926,67	1103,23
2 - 3	*4560,0	1103,23

* denotes a statistically significant difference.

Con un nivel de confianza del 95% bajo el proceso LSD, se puede asegurar que el tratamiento 1 y 2 son homogéneos se demuestra por los valores de DQO en algunos casos se disparaban y en otros se mantenía respecto al valor inicial, son significativamente diferentes del tratamiento 3 que logro dismiuir la DQO entre un 25 y 80% con los diferentes microorganismos.

Means and 95,0 Percent LSD Intervals

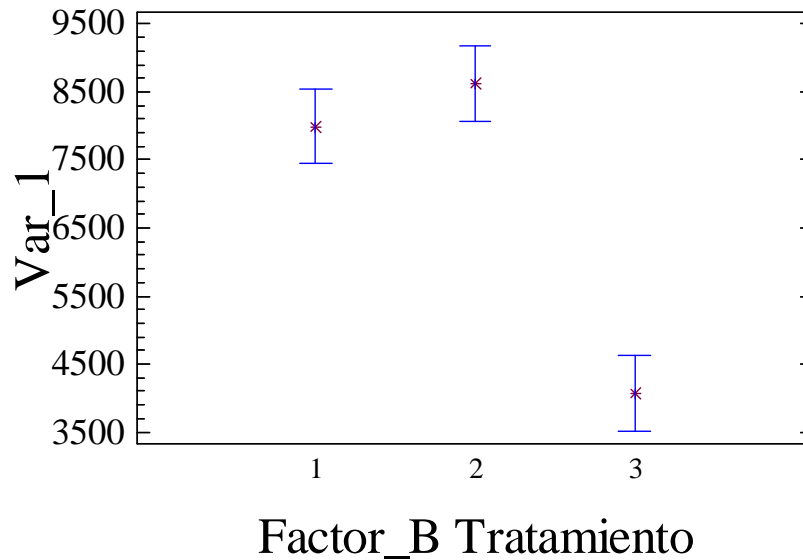


GRAFICO 11. FACTOR B TRATAMIENTOS CON EL MÉTODO LSD

Los intervalos de los Tratamientos se traslapan. Como podemos observar en la gráfica tratamiento 1 y 2 colaboran menos para disminuir la DQO; mientras que el tratamiento 3 logra disminuir la DQO en una concentración del 25% de 4000 mg/L hasta valores en un rango de 800 a 3000mg/L. Se puede verificar que estadísticamente son diferentes en media, el tratamiento 3 de todos los demás.

3.3.1.3 Factor C: Concentración

TABLA 18. FACTOR C CONCENTRACIÓN CON EL MÉTODO LSD

Multiple Range Tests for Var_1 by Factor_C Concentracion

Method: 95,0 percent LSD

Co	Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
n	25%	24	3683,33	X
un	5%	24	5703,33	X
	50%	24	11300,0	X

niv	Contrast	Difference	+/- Limits
el	25% - 5%	*-2020,0	1103,23
de	25% - 50%	*-7616,67	1103,23
	5% - 50%	*-5596,67	1103,23

con * denotes a statistically significant difference.

fianza de 95% bajo el procedimiento LSD, se concluye que las concentraciones de 5%, 25% y 50% son significativamente diferentes.

Means and 95,0 Percent LSD Intervals

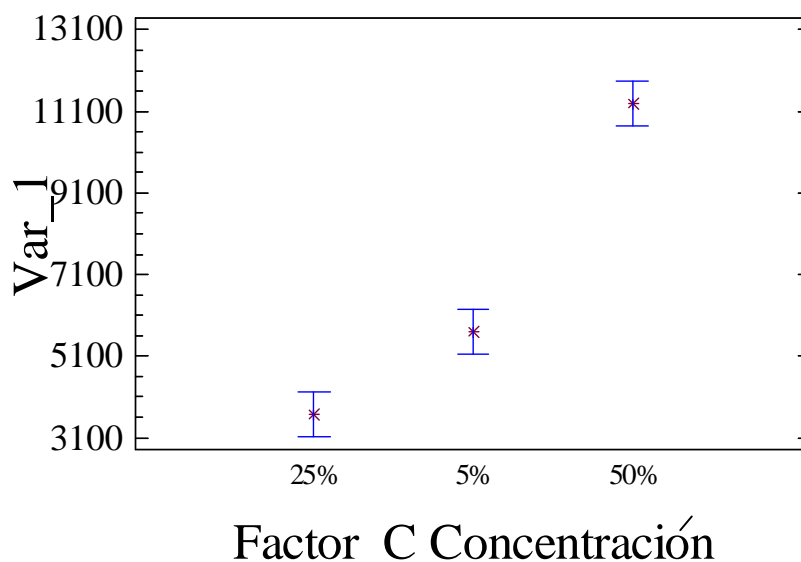


GRAFICO 12. FACTOR C CONCENTRACIÓN CON EL MÉTODO LSD

La gráfica muestra medias para las posiciones y no se traslapan, lo que indica que existe suficiente evidencia para concluir que las concentraciones tienen efecto en la disminución de DQO.

3.3.2 INTERPRETACIÓN DE EFECTOS ACTIVOS

Antes de comenzar a interpretar conviene tener presente que el interés es minimizar el DQO inicial, de tal forma que se determine la combinación que corresponde a los puntos más bajos en las gráficas. En la Var_1 se registra el DQO final.

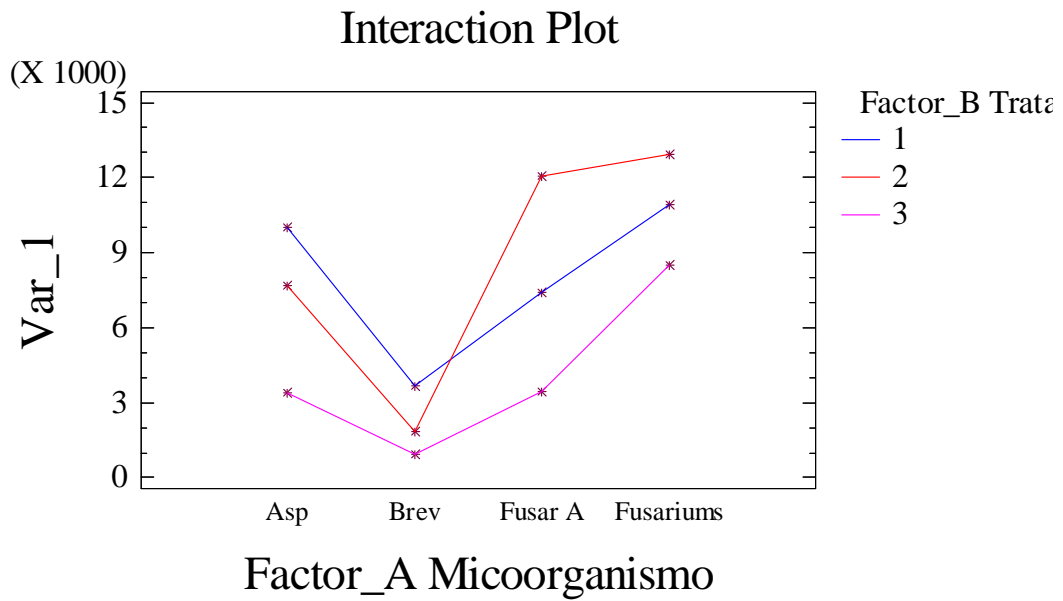


GRAFICO 13. ILUSTRACIÓN DE INTERACTION PLOT FACTOR A VS FACTOR B

En base a la ilustración de Interaction Plot Factor A Microorganismo relacionado con el Factor B Tratamiento, se determina que el microorganismo más eficiente es Brevundimonas diminuta utilizando el tratamiento 3.

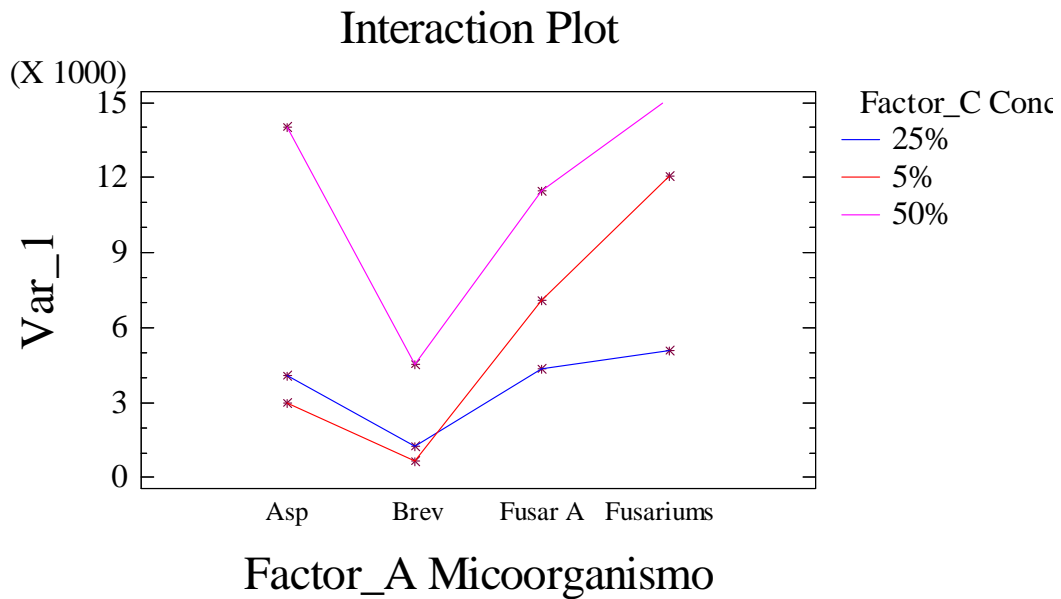


GRAFICO 14. ILUSTRACIÓN DE INTERACTION PLOT FACTOR A VS FACTOR C

De acuerdo a la ilustración de Interaction Plot Factor A Micoorganismo relacionado con el Factor C Concentración se concluye que la mejor prueba de degradación concentración es a 5%.

3.3.3 VERIFICACIÓN DE SUPUESTOS

Los supuestos de normalidad, varianza contante e independecia de los residuos en un diseño factorial se verifican principalmente con los métodos gráficos.

Residual Plot for Var_1

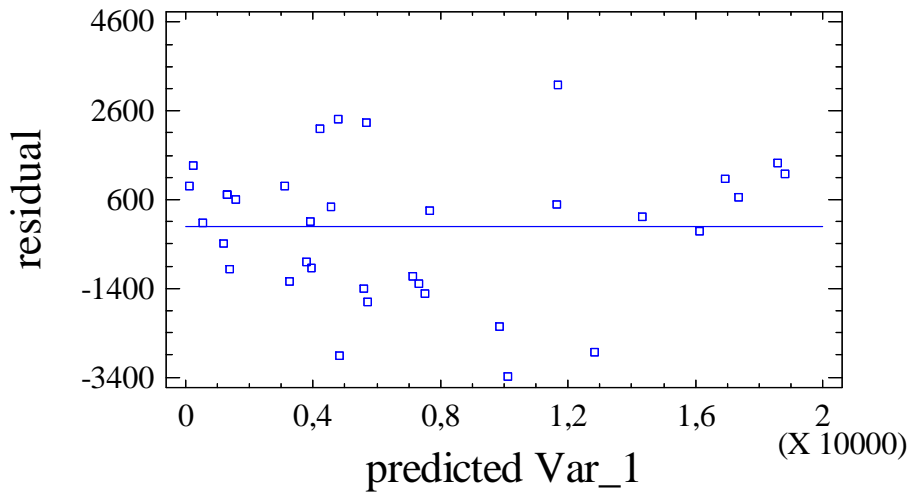


GRAFICO 15. RESIDUOS VS PREDICHOS DE LA VAR_1 VS FACTOR C

Interaction Plot

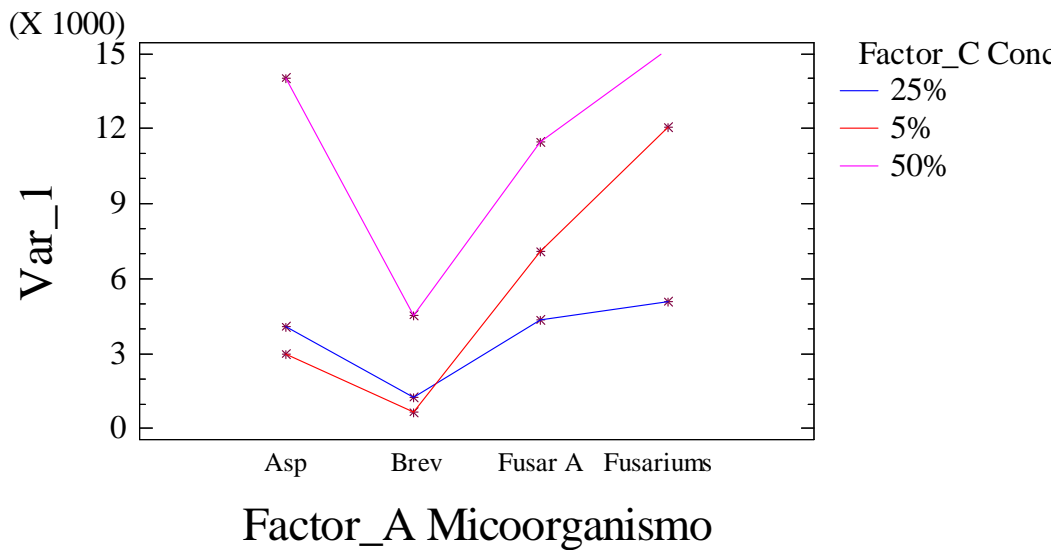


GRAFICO 16. RESIDUOS VS PREDICHOS DE LA VAR_1 VS FACTOR C

La independencia se verifica desde el momento inicial en que se realizó las observaciones. En la figura que ilustra residuos vs predichos de la var_1 se cumple el supuesto de varianza constante, al caer todos los puntos dentro de una banda horizontal. De igual manera, se cumple la normalidad al caer los residuos alineados en la gráfica de probabilidad normal.

Otro aspecto importante a observar en estas gráficas es la ausencia de observaciones atípicas o aberrantes.

3.4 PROPUESTA.

Se propone continuar con la investigación ya que es de suma importancia para la industria de la extracción de aceite rojo no solo porque representa un beneficio para ellos sino porque estamos ayudando al ambiente al usar microorganismos nativos del agua residual.

3.5 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la tabla 10 los resultados de la DQO realizada al sexto día de inoculado los microorganismos los valores altos se presentan en los hongos, y la bacteria *brevundimonas* degrado mejor la carga orgánica.

Fusarium avenaceum: los dos primeros tratamientos disparan los resultados al parecer la carga orgánica es demasiado para la concentración de microorganismos, en el tercer tratamiento se logra bajar la DQO de 2240 a 1920 mg/L aunque no es un valor representativo.

Fusarium solani: en este microorganismo los resultados obtenidos son altos y la DQO incrementa de manera proporcional con la concentración del hongo.

Aspergillus fumigatus: no se disparan de manera elevada los valores de la DQO, tolera más que los otros dos hongos la carga orgánica presente en el residual.

Brevundimonas diminuta: la bacteria dio mejor resultado respecto a la degradación de la carga orgánica del residual, en los 3 tratamientos bajo la DQO de manera representativa.

En la tabla 11 tenemos las pruebas realizadas del residual al 25% la bacteria presento los valores más bajos de DQO y los hongos mejoraron su degradación en esta concentración.

Fusarium avenaceum y Fusarium solani: no se dispara demasiado el valor en comparación con la tabla anterior, en el tercer tratamiento la DQO baja en un 40 y 25% respectivamente.

Aspergillus fumigatus: el primer tratamiento no se eleva de manera exagerada el valor de la DQO mientras que en el segundo se mantiene y en el tercero se presenta una disminución del 45% respecto al valor inicial.

Brevundimonas diminuta: en los tres tratamientos presenta disminución de la DQO con valores menores al 50% de la carga inicial usada en la prueba.

En la tabla 12 tenemos los resultados de las pruebas en el residual a una concentración del 50%, los hongos decaen en su actividad degradadora.

Fusarium avenaceum y Fusarium solani: bajan la capacidad de degradación en los dos primeros tratamientos se eleva la DQO y en el tercero no baja de manera representativa.

Aspergillus fumigatus: al igual que los hongos fusarium decae su capacidad degradativa en el tratamiento 1 y 2. En el tercer tratamiento disminuye la DQO en 29%.

Brevundimonas diminuta: la bacteria dio mejores resultados en comparación con los hongos pues se logró bajar al 19 % 1600 mg/L la DQO en comparación con el valor inicial de la concentración al 50% que fue de 8400 mg/L.

Comparando los valores obtenidos en las tabla tenemos que en el N° 10 son más elevados respecto a los hongos, esto se debe que el análisis de la demanda química de oxígeno se realizó a los 6 días de inoculados los microorganismos en este tiempo recién están

empezando la degradación por lo tanto la demanda bioquímica de estos es alta provocando que se dispare el valor de la demanda química de oxígeno.

En la tabla N° 11 trabajan mejor los hongos en comparación con el tabla N° 10; pues en la prueba con residual al 25% se dejó actuar los microorganismos por más tiempo (15 días), en cuanto a la bacteria *brevundimonas* dio el mejor resultado en comparación con los hongos.

La bacteria *brevundimonas* en las tres pruebas cuadros N° 10, 11 y 12 da buenos resultados en la degradación de la carga orgánica contenida en el residual de la extractora de palma aceitera.

En cuanto al desempeño de los hongos estos no dan tan buen resultado en poco tiempo (tabla N°10) pero al transcurrir el tiempo mejoran su capacidad degradativa (tabla N°11), aunque en concentraciones ya elevadas empiezan a decaer en su actividad (tabla N°12).

Los cuatro microorganismos en las tres pruebas presentaron mejorías en cuanto al olor del agua residual.

Respecto a la coloración bajo el tono lodoso característico que presenta el agua residual de las extractoras de aceite de palma aceitera, aunque *Fusarium avenaceum* y la bacteria *brevundimonas* le dieron un tono ligeramente rojizo al agua, esto debido a que el hongo *Fusarium avenaceum* le dio color rojo al agar PDA, y la bacteria *brevundimonas* se sembró en agar Macconkey.

La familia de hongo *Aspergillus* ha sido utilizada en biotecnología para diferentes propósitos entre estos tenemos la remoción del color de lodos provenientes de la industria textil con una eficiencia del 80.55%, biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados en el cual se utilizó en consorcio con otros hongos en biopilas con buenos resultados, relacionando con *Aspergillus fumigatus* utilizado en la presente investigación podríamos decir que se llega a la concordancia de que el hongo ayuda a la remoción del color.

En comparación con la especie *Fusarium* que también se aisló en el residual de la extractora, *Aspergillus fumigatus* es el hongo que logro bajar de 4000 a 2200mg/L valor de la DQO con una concentración del 25% de residual (tabla N° 11) en las diferentes pruebas realizadas.

Los hongos de la familia Fusarium son usados más para investigaciones relacionadas a la agricultura ya que es considerado un microorganismo fitopatógeno.

La familia *Pseudomonas* es un grupo de bacteria usado ampliamente en la biotecnología no solo en plantas para tratamiento de aguas residuales sino en diversos tipos de investigación como producción de biofertilizantes, biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, como catalizador en transesterificación de aceite de desecho con metanol, degradación de parafinas, producción de metabolitos antimicrobianos, entre otros todos dando excelentes resultados.

En el residual de la extractora de palma aceitera se obtuvo cepas de *brevundimonas diminuta* con las cuales se obtuvo los mejores resultados en las pruebas de degradación realizadas pues en todos los tratamientos se logró bajar el valor inicial de la DQO, los valores mas bajos de cada tratamiento fueron (tabla N°10) 2240 a 400 mg/L, (tabla N°11) 4000 a 800mg/L, y de 8400 a 1600 mg/L (tabla N° 12).

En la tabla N° 13 se encuentran los porcentajes de remoción alcanzados con *brevundimonas* donde podemos observar que se puede llegar hasta un 82% de remoción de la carga contaminante existente en el efluente.

CAPÍTULO 4

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES.

1. Se realizó la caracterización del residual, donde podemos deducir que es un residual ácido con un valor de DQO de 20.000 mg/L, que nos indica que contiene alta carga orgánica.
2. Se aisló y purifico cepas de los microorganismos presentes en el agua residual entre ellos varios hongos identificados como *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*, y la bacteria *Brevundimonas diminuta*.
3. Durante las pruebas de degradación, los hongos *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*, funcionaron mejor con el tercer tratamiento a una concentración del 25% de residual.
4. La bacteria aislada del residual *Brevundimonas diminuta* dio los mejores resultados en todas las pruebas realizadas, pues en una concentración de 50% de residual se obtuvo después del tratamiento un valor de 1600 mg/L a partir de 8400 mg/L como valor inicial.
5. Se logro reducir el olor característico del efluente.

6. El mayor porcentaje de remoción que se logro con *brevundimonas* es de 82% en el tratamiento 3 en el residual con una concentración al 5%.

4.2 RECOMENDACIONES.

1. Probar los microorganismos encontrados en otro tipo de agua residual.
2. Se recomienda trabajar con los microorganismos en conjunto para comprobar su eficacia al degradar materia orgánica.
3. Continuar con las pruebas de degradación de manera específica para obtener la dosificación exacta al 100% del residual.
4. Realizar una bioestimulación con *brevundimonas* puesto que nos dio mejor resultados durante las pruebas de degradación.
5. La Facultad de Ciencias siga con la investigación, pues en la industria de la extracción de aceite rojo de palma africana no se encuentra mucha información sobre microorganismos específicos, además el aislamiento y las pruebas de degradación es un tema amplio e interesante desde el punto de vista biotecnológico y ambiental.

RESUMEN

Se realizó el aislamiento e identificación de varios hongos y bacterias a partir del efluente de una extractora de aceite rojo de Palma Africana, con el fin de obtener información sobre los tipos de microorganismos existentes en el residual, que puedan ser usados como agentes biorremediadores.

Aplicando método experimental se partió del agua residual que previamente se caracterizó para diluir a varias concentraciones y se procedió a sembrar en diferentes medios de cultivos como Macconkey, PDA, se usaron materiales como cajas Petri, pipetas, erlenmeyer, equipos como cámara de flujo laminar, incubadora, autoclave y técnicas de temperatura, pH, aceites y grasas, DQO, siembra microbiológica. Una vez identificados se los sometió a pruebas para comprobar su capacidad degradadora en el residual diluido al 5, 25 y 50%.

Se obtuvo cepas de *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*, y *Brevundimonas diminuta*.

Cada microorganismo se dosificó en tres tratamientos donde se midió la DQO antes y después de las pruebas, con *Brevundimonas diminuta* de 8400 se pudo llegar a una DQO de 1600 mg/L en tanto que con *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus* la disminución de DQO se dio en un 25 y 40%. Tanto los hongos como la bacteria mejoraron el olor característico del agua residual, también se observó remoción del color.

Los resultados de los ensayos realizados en el laboratorio lleva a concluir que: es posible aislar microorganismos nativos y usarlos en la degradación de carga orgánica.

SUMMARY

Insolation and identification of various fungi and bacteria from the effluent of a red oil extractor of African Palm Tree were carried out to obtain information on the types of organisms existing in the residue, which can be used as bioremediation agents.

Applying the experimental method residual water previously characterized was the starting point to dilute at various concentrations; sowing was carried out in different culture media such as MacConkey and PDA in the laminar flow chamber. After having been identified they were subjected to tests to assess their degrading capacity in the residue at 5, 25, and 50%.

Strains of *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus* and *Brevundimonas diminuta* were obtained.

Each microorganism was dosed into the treatments where the DQO before and after the testing was measured; with *Brevundimonas diminuta* of 4800 it was possible to reach a DQO of 1600 mg/L, while with *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus fumigatus* the decrease of DQO was given by 25 and 40%. Both the fungi and bacteria improved the characteristic smell of residual water; the color grinding was also observed.

The lab trial results show that it is possible to isolate native organisms and use them in the organic load degrading.

BIBLIOGRAFÍA.

1. ARELLANO, A. Tratamientos de Aguas Residuales. (notas de clase).
2. CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE PALMA AFRICNA. (CENIPALMA). Manejo de Efluentes de Plantas Extractoras. Bogotá, CENIPALMA, 2008. Boletín técnico no 11.
3. FEDERACIÓN NACIONAL DE CULTIVADORES DE PALMA DE ACEITE. Manejo Ambiental de los Efluentes y las Emisiones Procedentes de la Extracción del Aceite de Palma. Memorias XI Conferencia Internacional sobre Palma de Aceite. Barranquilla, 16 de junio 1995. (documento).
4. MADIGAN, M. T., J. M. MARTINKO Y J. PARKER. *BROCK*. Biología de los Microorganismos. Barcelona, Prentice Hall Iberia, España, 2003.
5. METCALF y EDDY. Ingeniería de Aguas Residuales: tratamiento, vertido y reutilización, México, McGraw-Hill. (1995).
6. MORENO, J., Aislamiento e Identificación de Cepas Microbianas Potenciales Productoras de Biosurfactantes. Tesis. Máster en Biotecnología, Riobamba, ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO, Escuela de Postgrado y Educación Continua (EPEC), 2001
7. ORTIZ, S., Inoculación Lagunas de Oxidación. (folleto informativo).
8. RAMOS, G. *Pleurotus Ostreatus* Cultivados en Residuos de Palma Aceitera como Importante Fuente Proteica para la Dieta. Tesis. Ing. Biotecnología Ambiental, Riobamba, ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, 2007.

9. RAMÍREZ, G., LUNA, M., y VELÁSQUEZ, M., Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª ed. , México, UNAM, 2006.
10. RAMALLO, R. Tratamiento de Aguas Residuales. Buenos Aires, Reverté, 1993.
11. VELOZ, N., Evaluación de los Fangos Activados de las Plantas Extractoras de Aceite de Palma para su uso como Bioabono. Máster. Biotecnología, Riobamba, ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO, Escuela de Postgrado y Educación Continua (EPEC). 2001
12. VULLO, D., WACHSMAN, L., y ALCHE, M. Microbiología en Práctica: manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. Argentina, Atlante, 2000.

BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET

13. AMAYA, B., GOMEZ, S., MALDONADO, C. Evaluación de tres Hongos Lignolíticos y Aspergillus Niger para Tratamiento de Aguas Residuales del Curtido de Pieles.
http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/congresos/TLAXCALA%202009/REVISTA/contaminacion/acervo/vol_24_3/1.pdf (en línea)
20110903
14. CARRILLO LEONOR. Los Hongos de los Alimentos y Forrajes.
<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/04htextoaspergilos.pdf> (en línea)
20112501

15. COLLAZOS, C., DÍAZ B. Ensayos de Biodegradabilidad Anaerobia de Efluentes Cervecero.
<http://www.ceachile.cl/revista/ARCHIVOS%20PDF/745.pdf> (en línea)
2011603

16. CONTRERAS L, GREBECHOVA R. Biosíntesis de las enzimas pectolíticas a partir de hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus* para aplicación en industria de alimentos.
<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/html/952/95260202/95260202.html> (en línea)
20110803

17. COSTA, M., LERCHUNDI, G., TORRES, M. Producción de Enzima Fitasa de *Aspergillus Ficum* con Residuos Agroindustriales en Fermentación sumergida y sobre Sustrato Sólido.
http://horizon.documentation.ird.fr/exldoc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_45-46/010006834.pdf (en línea)
20110903

18. FRÍAS, A., VILLA, P., TORRES, E. Metabolitos Antimicrobianos de *Pseudomona Aureginosa* cepa PPS.
http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2007_1/Metabolitos_Pseudomonas.pdf
(en línea)
20112202

19. GONZALEZ, Y., REINOSO, O., NUNGARAY, J. Potencial del Bagazo Tequilero para la Producción de Biopolímeros por Bacterias.
<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/730/73000314.pdf> (en línea)
2011203

20. GUADALUPE, G., CHAN, H. Caracterización de la Oxidación Anaerobia del Metano acoplada a la Desnitrificación por *Pseudomonas aureginosa*.
<http://biomedbiotec.homelinux.org/congreso2010/Trabajos/Biotecnologia/BTN21130820091214.pdf> (en línea)
20110203
21. HERNÁNDEZ, S., LINA M. Evaluación de la Capacidad de un aislado Bacteriano Nativo de *Pseudomonas* sp. como Potencial Degradador de Compuestos Cianurados.
<http://www.bdigital.unal.edu.co/1849/> (en línea)
20110903
22. HINCAPIE, G., RAMIREZ, M. Biodegradación de Poliuretano Residual empleando *Aspergillus Niger*.
<http://convena.upb.edu.co/ingeniar/documentos/Investigacion/BIODEGRADACIONPOLIUTERANO.pdf> (en línea)
20110403
23. JIMÉNEZ, M MARTÍNEZ, M. Identificación y Caracterización de una Bacteria Degradadora de Parafinas.
<http://revistas.concytec.gob.pe/pdf/ecol/v5n1-2/a16546%n1.pdf> (en línea)
20110207
24. LÓPEZ, M. Aislamiento, Purificación y Caracterización estructural de nuevos Principios Bioactivos a partir de Extractos Fúngicos.
<http://dspace.upv.es/xmlui/bitstream/handle/10251/1823/tesisUPV2520.pdf> (en línea)
20110203
25. MANOSALVAS, P. Remoción del color de lodos provenientes de la industria textil por *Aspergillus* sp.
<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/html/215/21514206/21514206.html> (en línea)
20111602

26. Manual de laboratorio Microbiología Aplicada. Aislamiento de 2 Microorganismos y Obtención de un Cultivo.
<http://www.azc.uam.mx/cbi/quimica/microbiologia/p12.pdf> (en línea)
20101503
27. OOI LING, H., LEE KEONG, H., CHAN KHOON, S., Conversión de Efluentes y Tusas en Fertilizante Orgánico con Cero Desperdicios.
http://www.fedepalma.org/palmas/28_2esp_tom2.shtm (en línea)
20110310
28. PELLIZZARI, E., FERNÁNDEZ, C. Cultivo de Aspergillus sección Nigri para la producción de amilasa.
<http://www1.unne.edu.ar/cyt/2002/07-Tecnologicas/T-054.pdf> (en línea)
20110203
29. REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA. Biorremediación de Lodos contaminados con Aceites Lubricantes usados.
<http://www.doaj.org/doaj?func=abstract&id=581778> (en línea)
20110203
30. RUEDA, R. Biodegradación por medio de Microorganismos Anaerobios.
<http://www.scribd.com/doc/47932577/Biodegradacin-por-medio-de-microorganismos-ANAEROBIOS.pdf> (en línea)
20112401
31. RODRIGUEZ, E. Aislamiento y Caracterización de Levaduras Antagonistas de Hongos Fitopatógenos de Cítricos.
http://www.revistavirtualpro.com/files/TIE10_201703.pdf (en línea)
20110203

32. ROUSSOS, S., PERRAUD, I. Aspergillus en Procesos de Fermentación.
http://horizon.documentation.ird.fr/exldoc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_45-46/010006834.pdf (en línea)
20110222
33. SANTILLANA, N. Producción de Biofertilizantes utilizando Pseudomonas sp.
<http://revistas.concytec.gob.pe/pdf/ecol/v5n1-2/a12v5n1-2.pdf> (en línea)
20110203
34. SOCIEDAD MEXICANA DE MICOLOGÍA. Antagonismo in vitro de Cepas de Aspergillus y Trichoderma hacia Hongos filamentosos que afectan al Cultivo del Ajo.
<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/html/883/88302605/88302605.html> (en línea)
20110203
35. TELLEZ, J., RÍOS, E., LÓPEZ, V. Transesterificación de Aceite de desecho con Metanol utilizando Células completas de Metanol.
<http://biomedbiotec.homelinux.org/congreso2010/Extensos/Biotecnologia/BTN213JAB20091214.pdf> (en línea)
20110903
36. VELASQUEZ J.A., BELTRAN D., PADILLA L. Obtención de Ácido Cítrico por Fermentación con Aspergillus Niger utilizando Sustrato de Plátano Dominic Harton maduro.
<http://revistas.ut.edu.co/index.php/TUMBAGAV/article/viewFile.pdf>. (en línea)
20110903

ANEXOS

ANEXO Nº 1. INSTRUCTIVO ANÁLISIS DE TEMPERATURA

- Introducir el termómetro en la muestra.
- Cuando que se estabilice la lectura.
- Ver cuánto marca en la escala.
- Retirar el instrumento y lavarlo.

ANEXO Nº 2. INSTRUCTIVO ANÁLISIS DE PH

- Encender el equipo e introducir el electrodo del pH-metro en la muestra.
- Cuando se estabilice la lectura en el indicador, leer el valor.

ANEXO Nº 3. INSTRUCTIVO ANÁLISIS DE SÓLIDOS TOTALES

- Tomar una muestra de 50 mL exactos colocándola en la cápsula de porcelana junto con el algodón y el papel filtro, previamente pesados, registrar este valor.
- Secar en el microondas de acuerdo al cuadro indicado más adelante.
- Realizar los cálculos de acuerdo a la formula indicada más adelante.

ANEXO Nº 4. INSTRUCTIVO ANÁLISIS DE ACEITES Y GRASAS

- Colocar la muestra en el capuchón de papel filtro y montar en el equipo Soxhlet.
- Pesarse el balón para la extracción.
- Someter a extracción hasta que el papel filtro esté blanco y el solvente en la camisa del Soxhlet sea incoloro. Evaporar el solvente del extracto aceitoso del balón y eliminar las trazas del éter colocando el balón en la estufa, aproximadamente 20 minutos.
- Dejar enfriar el balón hasta peso constante.

Tabla de secado para efluentes

MUESTRA	MICROONDAS
AGUAS LODOSAS (efluente, agua de piscinas)	Muestra 50g *Tiem 8 min / Pot 5 *Tiem 8 min / Pot 4 *Tiem 2 min / Pot 3

CÁLCULOS

Sólidos totales mg/L: $(W_2 - W_1) \times 20000$

Aceites y grasas mg/L: $(W_4 - W_3) \times 20000$

Donde:

- | | | | |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| ST: | Sólidos totales | W₃: | Peso del balón vacío |
| T: | Tiempo | W₄: | Peso del balón más el aceite extraído |
| Min: | Minutos | W₅: | Peso del aceite extraído |
| Pot: | Potencia | 20000: | Constante |
| W₁: | Peso cápsula más muestra fresca | mg/L: | miligramos / litros |
| W₂: | Peso de cápsula más muestra seca | | |

ANEXO Nº 5. INSTRUCTIVO ANÁLISIS DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO

MATERIALES Y EQUIPOS

1. Equipo de reflujo
2. Probeta de 50 mL
3. Pipeta graduada de 10 mL
4. Buretas graduadas
5. Perilla de succión
6. Balón aforado de 100 mL
7. Piseta
8. Balanza de precisión
9. Gotero
10. Vaso de precipitación de 50 mL

REACTIVOS

1. Solución de dicromato de potasio 0.25N
2. Sulfato de plata
3. Sulfato mercurico
4. Sulfato ferroso amoniacal 0.25 N
5. Ferroína
6. Ácido sulfúrico concentrado
7. Agua destilada

ACTIVIDADES

1. Tomar con una pipeta aforada 10 mL de la muestra diluída, de acuerdo al cuadro indicado más adelante y verter en el balón (conteniendo los núcleos de ebullición).
2. Agregar 0.2 g de sulfato mercúrico (como eliminador de inhibidores).
3. Añadir 1 mL del reactivo sulfato de plata en ácido sulfúrico y agitar para diluir el sulfato mercúrico.
4. Agregar 6 mL de la solución de dicromato de potasio y finalmente 13 mL más del reactivo sulfato de plata en ácido sulfúrico.
5. Mezclar (agitando en círculos).
6. Conectar el equipo de reflujo y someter a reflujo por 2 horas.
7. Cubrir el extremo abierto del condensador con un vaso pequeño.
8. Pasado el tiempo dejar enfriar el balón a temperatura ambiente.
9. Enjuagar con agua destilada al condensador (permitiendo que esta diluya la muestra del balón).
10. Sobre la muestra fría poner 2 a 3 gotas de indicador ferroína y titular el exceso de dicromato de potasio con la solución de sulfato ferroso amoniacal, siendo el punto final de la titulación el cambio de color azul verdoso a café rojizo.
11. Igualmente someter a reacción un “blanco”, añadiendo en lugar de la muestra, 10 mL de agua destilada.

CÁLCULOS

$$\text{D.Q.O (mg/ mL O}_2\text{): } \frac{(A - B) \times N \times 8000 \times F}{V}$$

Dónde:

A: mL de sulfato ferroso amoniacal para el blanco

F: Factor de dilución (veces que la muestra es diluida)

B: mL de sulfato ferroso amoniacal para la muestra

V: Volumen de la muestra

N: Normalidad del sulfato ferroso amoniacal: 0.25 N

ml: Mililitros

L: Litros

8000: Peso equivalente del oxígeno multiplicado por 1000 (ml a l)

ANEXO Nº 6. SIEMBRA EN MEDIO SOLIDO

En superficie

- Se colocan 0.1 mL de la dilución de la muestra con pipeta estéril en el centro de la placa, y se distribuye con un rastrillo estéril.
- Se siembra con un ansa para aislar, como se explica más adelante.
- Se siembra con un hisopo.

Incorporada

- Se coloca 1 mL de la muestra en una placa estéril vacía, en el centro de la misma. Sobre ella se agregan 20 mL de medio de cultivo fundido y termostatzado a 45°C; luego se agita la placa, moviéndola 4 veces en sentido horario, 4 en sentido antihorario, una vez de arriba a abajo, una vez hacia los costados y una vez en sentido antihorario.
- Las placas se incuban invertidas, ya que la alta concentración de agua en el medio puede provocar condensación durante la incubación y si cae sobre la superficie del agar, se extiende dando un crecimiento confluyente.

ANEXO Nº 7. IDENTIFICACION DE FUSARIUM AVENACEUM



**OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
INFORME DE RESULTADOS**



INF.LAB.MI.19501
ORDEN DE TRABAJO No. 029793

SOLICITADO POR:	Rodriguez Zambrano Paola
DIRECCIÓN DEL CLIENTE:	Quininde
MUESTRA DE:	Cultivo microbiano
DESCRIPCION:	Caja petri con medio de cultivo AGAR EXTRACTO DE MALTA – HONGO HB4
LOTE:	-----
FECHA DE ELABORACION:	-----
FECHA DE VENCIMIENTO:	-----
FECHA DE RECEPCION:	14/12/2010
HORA DE RECEPCION:	10h06
FECHA DE ANALISIS:	15/12/2010
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS A LA SECRETARIA:	17/01/2011
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	
COLOR:	Característico
OLOR:	Característico
ESTADO:	Sólido
CONTENIDO DECLARADO:	1 caja petri
CONTENIDO ENCONTRADO:	-----
OBSERVACIONES:	Los Resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.
MUESTREADO POR:	EL CLIENTE

OSP
INFORME

OBSERVACION MACROSCOPICA	RESULTADOS
Diámetro de las colonias (5 días)	> a 4 cm (Crecimiento 7 días)
Color parte superior	Rojizo, algodonoso
Color parte inferior	Sombras rojizas
Densidad	Abundante de micelio aéreo
OBSERVACION MICROSCOPICA	
Conidioforos	Simple con pocas ramificaciones
Células conidiogénicas	Fusiformes, con 0 a 3 septos
Microconidias	Presentes en micelio aéreo, de forma oval
HONGO	Fusarium avenaceum

ANEXO Nº 8. IDENTIFICACION DE FUSARIUM SOLANI.



**OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
INFORME DE RESULTADOS**



INF.LAB.MI.19502
ORDEN DE TRABAJO No. 029793

SOLICITADO POR:	Rodriguez Zambrano Paola
DIRECCIÓN DEL CLIENTE:	Quininde
MUESTRA DE:	Cultivo microbiano
DESCRIPCION:	Caja petri con medio de cultivo AGAR EXTRACTO DE MALTA – HONGO HB
LOTE:	-----
FECHA DE ELABORACION:	-----
FECHA DE VENCIMIENTO:	-----
FECHA DE RECEPCION:	14/12/2010
HORA DE RECEPCION:	10h06
FECHA DE ANALISIS:	15/12/2010
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS A LA SECRETARIA:	17/01/2011
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	
COLOR:	Característico
OLOR:	Característico
ESTADO:	Sólido
CONTENIDO DECLARADO:	1 caja petri
CONTENIDO ENCONTRADO:	-----
OBSERVACIONES:	Los Resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.
MUESTREADO POR:	EL CLIENTE



INFORME

OBSERVACION MACROSCOPICA	RESULTADOS
Diámetro de las colonias (5 días)	> a 3 cm (Crecimiento 7 días)
Color parte superior	Durazno, algodonoso
Color parte inferior	Amarillento
Densidad	Abundante de micelio aéreo
OBSERVACION MICROSCOPICA	
Células conidiogénicas	Con 0 a 3 septos
Microconidias	Presentes en micelio aéreo, de forma oval
HONGO	Fusarium solani

ANEXO Nº 9. IDENTIFICACION DE ASPERGILLUS FUMIGATUS.



**OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
INFORME DE RESULTADOS




INF.LAB.MI.19500
ORDEN DE TRABAJO No. 029793

SOLICITADO POR:	Rodriguez Zambrano Paola
DIRECCIÓN DEL CLIENTE:	Quininde
MUESTRA DE:	Cultivo microbiano
DESCRIPCION:	Caja petri con medio de cultivo AGAR EXTRACTO DE MALTA – HONGO HA
LOTE:	-----
FECHA DE ELABORACION:	-----
FECHA DE VENCIMIENTO:	-----
FECHA DE RECEPCION:	14/12/2010
HORA DE RECEPCION:	10h06
FECHA DE ANALISIS:	15/12/2010
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS A LA SECRETARIA:	17/01/2011
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	
COLOR:	Característico
OLOR:	Característico
ESTADO:	Sólido
CONTENIDO DECLARADO:	1 caja petri
CONTENIDO ENCONTRADO:	-----
OBSERVACIONES:	Los Resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.
MUESTREADO POR:	EL CLIENTE

INFORME


OBSERVACION MACROSCOPICA	RESULTADOS
Diámetro de las colonias (5 días)	0.5 a 3 cm (Crecimiento 7 días)
Color parte superior	Verde oscuro
Color parte inferior	Amarillo
Densidad	Abundante
OBSERVACION MICROSCOPICA	
Conidias	Dispuestas en forma radiada
Vesículas	En forma de clavo
Conidioforos	Verdes, densa capa
HONGO	Aspergillus fumigatus

ANEXO Nº 10. IDENTIFICACION DE BREVUNDIMONAS DIMINUTA.



OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
INFORME DE RESULTADOS



INF.LAB.MI.19535
ORDEN DE TRABAJO No. 029793

SOLICITADO POR:	Rodriguez Zambrano Paola
DIRECCIÓN DEL CLIENTE:	Quininde
MUESTRA DE:	Cultivo microbiano
DESCRIPCION:	Caja petri con medio de cultivo AGAR MacCONKEY
LOTE:
FECHA DE ELABORACION:
FECHA DE VENCIMIENTO:
FECHA DE RECEPCION:	14/12/2010
HORA DE RECEPCION:	10h06
FECHA DE ANALISIS:	15/12/2010
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS	21/01/2011
A LA SECRETARIA:
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	
COLOR:	Característico
OLOR:	Característico
ESTADO:	Sólido
CONTENIDO DECLARADO:	1 caja petri
CONTENIDO ENCONTRADO:
OBSERVACIONES:	Los Resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.
MUESTREADO POR:	EL CLIENTE

INFORME

*OBSERVACION MACROSCOPICA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	2-5 mm
Forma	Circular
Elevación	Plana
Margen	Regular
Color	Crema
Superficie	Brillante
Densidad	Escasa
Consistencia	Butirosa
*OBSERVACION MICROSCOPICA	
Coloración Gram	Negativo
Esporas	Negativo
Morfología celular	Bacilos
*BACTERIA	Brevundimonas diminuta

ANEXO Nº 11. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CRECIMIENTO.

NaNO ₃	7g
KH ₂ PO ₄	0.5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1g
CaCl ₂	0.01g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Extracto de Levadura	0,01g
H ₃ BO ₄	0,26g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.5g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5g
MoNa ₂ O ₄ .2H ₂ O	0,06g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,7g

ANEXOS DE FOTOS

FOTOGRAFÍA Nº 1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO

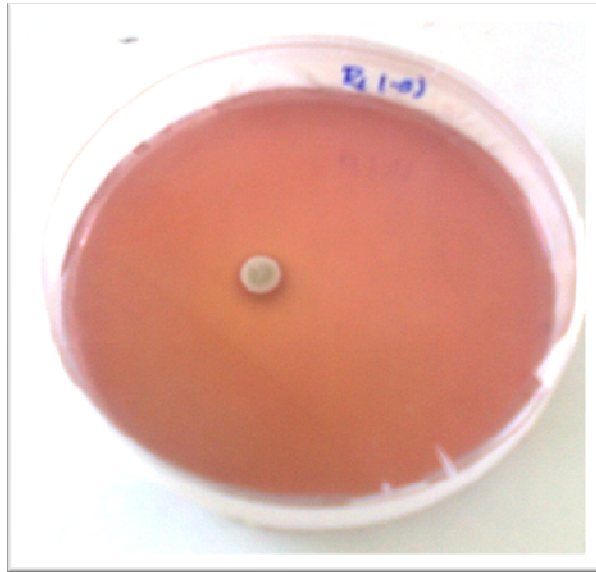


FOTOGRAFÍA Nº 2.
MEDIO DE

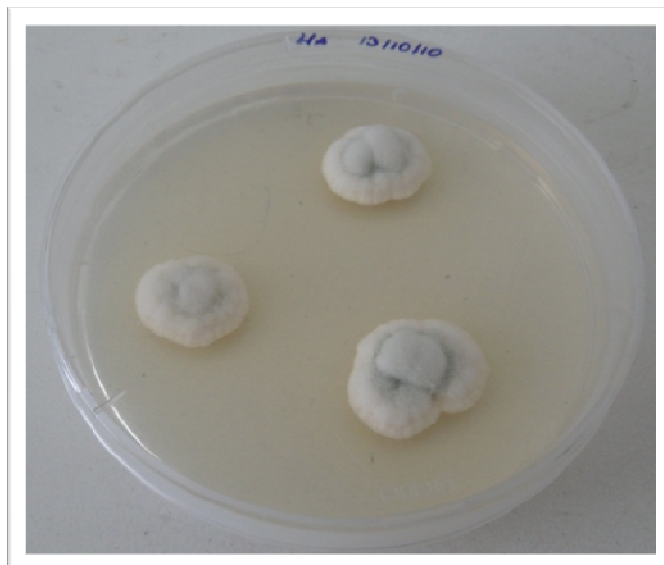


AGITACIÓN DEL
ENRIQUECIMIENTO

FOTOGRAFÍA N° 3. COLONIAS DE *BREUVUNDIMONAS DIMINUTA*



FOTOGRAFÍA N° 4. COLONIA DE *ASPERGILLUS*



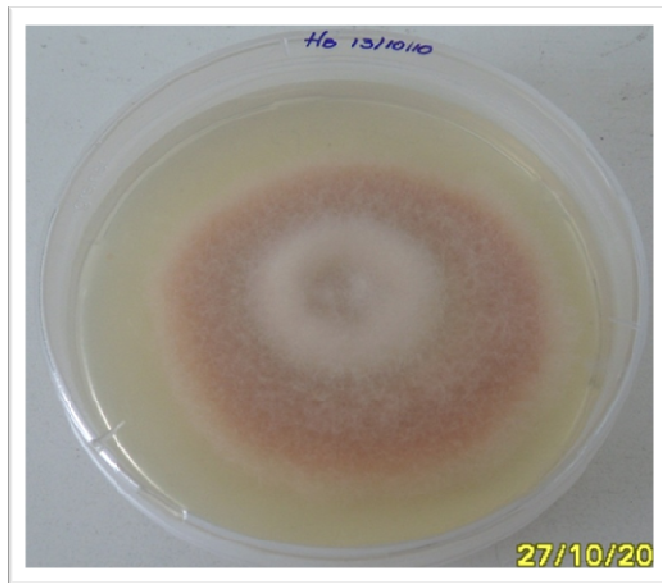
FOTOGRAFÍA Nº 5. COLONIAS DE *ASPERGILLUS*



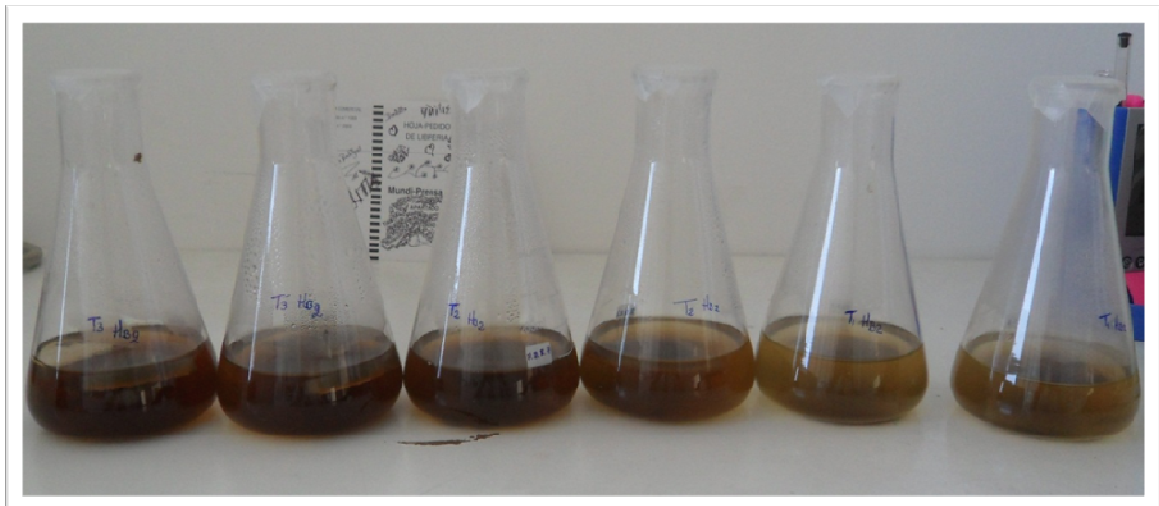
FOTOGRAFÍA Nº 6. COLONIAS DE *FUSARIUM*



FOTOGRAFÍA Nº 7. CEPA DE *FUSARIUM SOLANI*



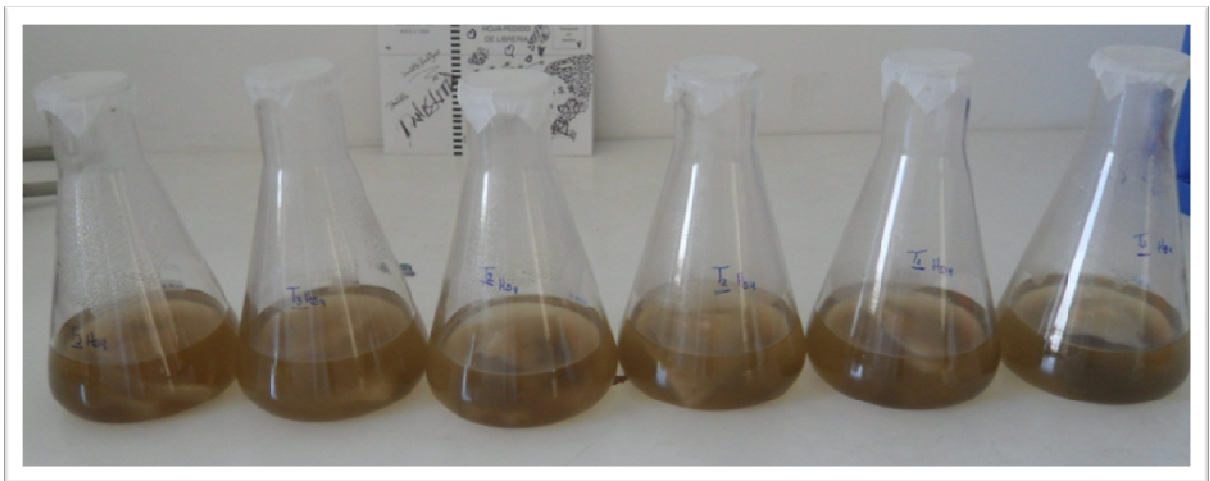
FOTOGRAFÍA Nº 8. CEPA DE *FUSARIUM AVENACEUM*



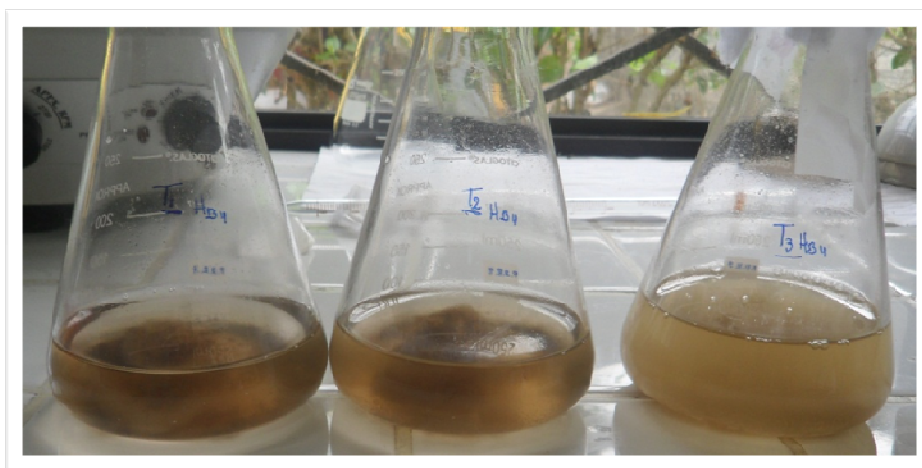
FOTOGRAFÍA Nº 9. INICIO DE LAS PRUEBAS DE DEGRADACIÓN



FOTOGRAFÍA Nº 10. PRUEBAS DE DEGRADACIÓN SEXTO DÍA



FOTOGRAFÍA N° 11. PRUEBAS DE DEGRADACIÓN DECIMO DÍA



FOTOGRAFÍA N° 12. PRUEBAS DE DEGRADACIÓN QUINCE DÍAS