

DESARROLLO DE UN BIOINÓCULO MICROBIANO CON ACTIVIDAD LIPOLÍTICA PARA LA BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE ACEITES DOMÉSTICOS EN UN SISTEMA DE COMPOSTAJE.

DEVELOPMENT OF A MICROBIAL BIOINOCULUM WITH LIPOLYtic ACTIVITY FOR BIODEGRADATION OF WASTE OILS IN HOUSEHOLD COMPOSTING SYSTEM.

AUTORES: Vásquez Alarcón Álvaro Eduardo¹, Arbeláez Lina María²

RESUMEN

Los aceites domésticos son residuos que tienen una disposición final inadecuada, convirtiéndose en grandes contaminantes para los cuerpos de aguas; estos compuestos deben ser degradados a productos no tóxicos con el fin de reducir su impacto en el medio ambiente y además obtener un producto benéfico a partir de su descomposición.

OBJETIVO: Este proyecto busca degradar las grasas por medio de un proceso biotecnológico, como lo es el compostaje; además se adicionarán microorganismos lipolíticos bien adaptados y aislados de fuentes con alta carga orgánica de aceites, con el fin de potencializar su actividad y mejorar la eficiencia de descomposición.

METODOLOGÍA: Se utilizó lo siguiente: Reactivación de microorganismos conservados por el programa de biotecnología y la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Aislamiento de microorganismos endógenos del compostaje pre-establecido con actividad lipolítica, Determinación de la actividad lipolítica de los aislamientos endógenos del compostaje, Identificación parcial de los aislados endógenos del compostaje, Ensayos de antagonismo entre los aislamientos seleccionados, Montaje del compostaje y la Medición de la degradación de aceites domésticos.

RESULTADOS: Se evidenció que estos son concordantes con lo reportado por los autores descritos anteriormente. El medio Czapek 3% fue el ideal para los aislamientos a partir del compostaje, el cual fue estandarizado con los aceites residuales domésticos de nuestra zona. Los aislamientos fueron conservados a -20°C, lo que permitirá su uso para las siguientes fases.

CONCLUSIONES: Se encontraron tres aislamientos,

dos bacterias y un hongo, con buena actividad lipolítica a partir de la muestra del compostaje. Así mismo se observó una relación no antagónica entre el hongo HR y las bacterias S y R. Sin embargo, existe un marcado antagonismo de *Pseudomonas* sp. y *Trichoderma* sp. frente a los otros aislamientos obtenidos.

PALABRAS CLAVE: Aislamiento, bacterias, hongos, compostaje.

ABSTRACT

Domestic waste oils are inadequate disposal have become great pollutants to water bodies; these compounds must be degraded to non-toxic products in order to reduce their impact on the environment and also get a benefit from product decomposition.

OBJECTIVE: This project seeks to break down fats by a biotechnological process, such as the composting; well adjusted and well isolated from sources with high organic oils, in order to potentiate their activity and improve the efficiency of decomposition will be added lipolytic microorganisms.

METHODOLOGY: Reactivating kept by the biotechnology program and the Corporation for Biological Research (CIB) Isolation of endogenous microorganisms pre-established composting lipolytic activity, Determination of the lipolytic activity of endogenous isolates composting microorganisms: The following was used , part of endogenous isolated composting, tests antagonism between the selected isolates Mounting composting and degradation measurement domestic oils ID.

RESULTS: It was evidenced that these are consistent with those reported by the authors described above. The Czapek 3% was ideal for insulation from composting, which was standardized with household waste oils in

¹Estudiante de Pregrado en Biotecnología – Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia

²Docente medio tiempo Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia

our area. The isolates were stored at -20 ° C, allowing its use for the following phases.

CONCLUSIONS: Three isolates, two bacteria and a fungus, with good lipolytic activity from the sample were found composting. Likewise a non-antagonistic ratio of the fungus and bacteria HR S and R. However it was found, there is a marked antagonism of *Pseudomonas* sp. and *Trichoderma* sp. compared to other isolates obtained.

KEYWORDS: Insulation, bacteria, fungi, composting.

INTRODUCCIÓN

La disposición final de grasas o aceites domésticos residuales es una problemática ambiental, debido a que un litro de aceite vertido por el desagüe puede contaminar 1000 litros de agua y se necesitan 25 años para su degradación en el ambiente. En España, las entidades Mancomunidad Comarca de Pamplona y Ekográs, recolectan aceite usado alcanzando cifras para el 2011 de hasta 118.363 litros de aceite usado y continúan con el proyecto de aumentar esta cifra para este año (1).

Los aceites domésticos pueden ser de origen animal o vegetal. Al recalentar estos aceites se producen hidrocarburos aromáticos policíclicos como: benzopireno, benzoantraceno, dibenzo antraceno, fluoranteno y píreno; todos éstos están incluidos dentro del grupo de hidrocarburos aromáticos policíclicos de gran potencia carcinogénica (2), por lo que su reutilización constituye un factor de riesgo para el consumidor final. Una alternativa para su gestión es su transformación a compuestos benéficos por medio de microorganismos con capacidad lipolítica, por la presencia de las enzimas lipasas, enzimas que hidrolizan los enlaces de ésteres de tri-, di-, y monoglicéridos. Los principales microorganismos reportados son: *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Moraxella* spp. y *Staphylococcus* spp.; entre los hongos tenemos a *Rhizopus* spp., *Geotrichum* spp., *Aspergillus* spp., *Mucor* spp. y *Penicillium* spp.; y entre las levaduras resaltan *Candida* spp., *Rhodotorula* spp. y *Hansenula* spp. (3).

Para la evaluación de la actividad lipolítica los microorganismos se siembran en medios de cultivos específicos suplementados con triglicéridos sintéticos como tributirin y trioleína, y otros ésteres sintéticos como los Tween (ésteres de sorbitan polioxietileno) y ésteres de metilumbeliferil (2).

Al obtener aislamientos con actividad lipolítica se pueden desarrollar bioinóculos microbianos con el fin de mejorar las condiciones de procesos biotecnológicos, como el compostaje. Esta tecnología permite degradar aceites domésticos hasta un 79%, con el objetivo

de entregar un producto final no tóxico para el medio ambiente (humus) y por el contrario benéfico por ser un fertilizante de alta calidad. Adicionalmente, este método se ha empleado para la degradación exitosa de aceites minerales (hidrocarburos) y residuos de procesos de extracción del petróleo (4).

Las principales fases de este proceso, dependiendo de la temperatura, son:

- Fase mesófila: ocurre en las dos primeras semanas. La temperatura puede llegar a los 40°C; los microorganismos más abundantes son las bacterias, predominando géneros como *Bacillus* sp., *Geobacillus* sp. y *Paenibacillus* sp.
- Fase termófila: empieza a los 13 días. Tiene temperaturas que oscilan entre los 60 y 70°C, predominando bacterias del género *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp. y *Paenibacillus* sp. El material más difícil de descomponer empieza a ser degradado y la alta temperatura es capaz de sanitizar patógenos, pero también puede eliminar la flora benéfica, además, varias enzimas responsables de la degradación se desnaturalizan.
- Fase de enfriamiento: ocurre entre los 27 y 48 días, la temperatura desciende hasta aproximadamente los 30°C; las bacterias predominantes son *Bacillus* sp., *Cellulomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp. y *Paenibacillus* sp., los hongos predominantes son *Aspergillus* sp., *Dactylaria* sp., *Mucor* sp., *Scopulariopsis* sp., *Trichothecium* sp. y *Verticillium* sp.
- Fase de Maduración: ocurre entre los 55 y 85 días. La temperatura se conserva entre los 25 y 30°C: las bacterias predominantes son *Bacillus* sp., *Brevundimonas* sp., *Cellulomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Paracoccus* sp., *Geobacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp. y *Paenibacillus* sp., los hongos predominantes son *Aspergillus* sp., *Acremonium* sp., *Mucor* sp., *Scopulariopsis* sp., *Trichothecium* sp., *Cephaliophora* sp., *Geotrichum* sp., *Gliocladium* sp. y *Verticillium* sp. Existe una baja tasa de actividad microbiana y una poca cantidad de sustratos y hay una descomposición muy avanzada de ácidos orgánicos y formación de compuestos húmicos (5).

Como se observa anteriormente, en este proceso interviene una gran diversidad de microorganismos, dándose la formación de consorcios que son difíciles de obtener en condiciones de laboratorio. Al realizar un proceso de compostaje con alta cantidad de aceite estas sucesiones microbianas permiten degradar gran cantidad estos compuestos, obteniendo un humus de alta calidad como producto final, resultados que han sido comprobados al biodegradar aceites domésticos de aguas residuales (4).

Con este proyecto se busca degradar los aceites domésticos residuales por medio de un proceso biotecnológico, como lo es el compostaje, el cual se potencializará por medio de microorganismos lipolíticos aislados de fuentes con alta carga orgánica de aceites, y así mejorar la eficiencia del proceso de descomposición. Los microorganismos aislados serán caracterizados morfológica y bioquímicamente por medio de técnicas tradicionales con el fin de definir los parámetros de este inóculo inicial, el cual se potencializará con la microbiota acompañante propia del compostaje. Se realizará un seguimiento continuo de los parámetros físicos, químicos y microbiológicos para controlar las variables e ir caracterizando el proceso que ocurre durante la degradación de los aceites en el compostaje. A su vez, el producto final será calificado por las variables de calidad que define el gobierno colombiano por medio de la NTC 5167, ya que este servirá para el abono de los jardines de la universidad.

Objetivo general: Desarrollar un bioinóculo microbiano con actividad lipolítica, a partir de aislamientos endógenos de un compostaje y aislados con actividad lipolítica reportada, para la biodegradación de residuos de aceites domésticos, en un sistema de compostaje.
Objetivos específicos:

1. Determinar la viabilidad de un co-cultivo de aislamientos microbianos obtenidos a partir de un compostaje frente a microorganismos con actividad lipolítica reportada.
2. Evaluar la eficiencia del bioinóculo en la degradación de aceites domésticos usados, empleando un sistema de compostaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Reactivación de microorganismos conservados por el programa de biotecnología y la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB): Se emplearon como microorganismos de referencia con actividad lipolítica comprobada una bacteria (*Pseudomonas* sp.) y un hongo (*Trichoderma* sp.). Inicialmente, se realizó la reactivación de estos microorganismo conservados a -4°C en agar PDA. Una vez reactivados se les realizó una prueba de actividad lipolítica en agar Lecitina.
- Aislamiento de microorganismos endógenos del compostaje pre-establecido con actividad lipolítica: Para el aislamiento de los microorganismos, se recolectaron muestras de un compostaje establecido en la Institución Universitaria Colegio Mayor de An-

tioquia (IUCMA), y dos compostajes del norte del departamento de Antioquia, el cual se encontraba en la fase meso-termófila. Se hicieron diluciones seriadas a partir de 1 gramo de suelo en solución salina 0,89% para posteriormente ser sembrados en Agar Czapek al 3%, medio cuya única fuente de carbono era el aceite residual (2). Una vez hubo crecimiento, se hizo la purificación de los microorganismos en Agar PDA y su posterior conservación en glicerol al 20%.

- Determinación de la actividad lipolítica de los aislamientos endógenos del compostaje: Ambos inóculos se prepararon en solución salina al 0,85%, el bacteriano se comparó frente a un patrón de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ cel/ml.) y para el fúngico se realizó una suspensión de esporas, haciendo el conteo en cámara de neubauer y se ajustó la concentración a 1×10^8 esporas/ml. De estos inóculos se sembraron $10 \mu\text{L}$ en círculos de papel filtro de un 1 cm de diámetro, los cuales estaban ubicados sobre el Agar Lecitina. Luego de 3 días de incubación a temperatura ambiente se midieron los halos de actividad.
- Identificación parcial de los aislados endógenos del compostaje. Se hizo caracterización macroscópica y microscópica de los microorganismos que mayor actividad lipolítica presentaron, utilizando tinción de Gram para las bacterias y tinción con azul de lactofenol para los hongos.
- Ensayos de antagonismo entre los aislamientos seleccionados. Los ensayos de antagonismo se hicieron en Agar PDA, para ello se sembraron líneas perpendiculares entre bacterias, entre hongos y entre hongos y bacterias con el fin de determinar si existía o no actividad antagónica entre ellos.
- Montaje del compostaje: El experimento se llevará a cabo sobre un sustrato sólido estéril con concentraciones conocidas de lípidos. El diseño experimental será un diseño completamente al azar con un factor; un control Positivo (peróxido de hidrógeno como agente químico), control negativo (agua destilada estéril), Aislamiento de referencia y aislamientos obtenidos. Las variables físicas que se determinarán serán: temperatura, pH, humedad relativa y conductividad semanalmente (por duplicado). Los análisis químicos se llevarán a cabo en el laboratorio especializado LACMA, para los cuales se tomarán 500 g del compost al inicio y al final, que serán destinados para los análisis de la relación C/N, Carbono orgánico total, Nitrógeno orgánico total.
- Medición de la degradación de aceites domésticos: Se tomarán muestras de los compostajes cada 15 días durante 12 semanas, las cuales se someterán

a un proceso de extracción utilizando el método de extracción de Soxhlet. Luego, se calculará el porcentaje de aceites biodegradados determinando los gramos de aceite presentes en el compost.

RESULTADOS PARCIALES

- Reactivación de aislamientos microbianos conservados por el programa de Biotecnología y la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB): Se hizo la reactivación exitosa del aislamiento bacteriano conservado por el programa de Biotecnología y del aislamiento fúngico conservado por la CIB. Ambos aislamientos tenían actividad lipolítica demostrada en Agar Lecitina, presentando un buen crecimiento a pesar de su conservación.
- Aislamiento de microorganismos endógenos del compostaje pre-establecido con actividad lipolítica: Se obtuvieron un total de 17 morfotipos bacterianos y 12 fúngicos.
- Determinación de la actividad lipolítica de los aislamientos endógenos del compostaje: Se seleccionaron dos bacterias (R y S) y un hongo (HR) con mayor actividad (mayor halo en Agar lecitina).
- Identificación parcial de los aislados endógenos del compostaje: Las colonias de los aislamientos R y S presentaron parámetros similares (características macroscópicas: Colonia blanca y amarilla respectivamente, redonda, borde liso, elevada, superficie lisa, cremosa. Características microscópicas: Cocos Gram positivos). Colonia HR: compatible con *Penicillium* sp. (características macroscópicas: Colonia de color rosa pálido, redonda, borde plumoso. Características microscópicas: Hifas hialinas septadas, esporas pequeñas, ovaladas).
- Ensayos de antagonismo entre los aislamientos seleccionados. Se observó antagonismo entre los microorganismos de referencia y los aislamientos observados. De igual forma no se encontró antagonismo entre los microorganismos aislados a partir del compostaje pre-establecido.

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los resultados observados se evidenció que estos son concordantes con lo reportado por los autores descritos anteriormente. El medio Czapek 3% fue el ideal para los aislamientos a partir del compostaje, el cual fue estandarizado con los aceites residuales domésticos de nuestra zona. Los aislamientos fueron conservados a -20°C, lo que permitirá su uso para las siguientes fases.

CONCLUSIONES

- Se encontraron tres aislamientos, dos bacterias y un hongo, con buena actividad lipolítica a partir de la muestra del compostaje.
- Se observó una relación no antagónica entre el hongo HR y las bacterias S y R. Sin embargo, existe un marcado antagonismo de *Pseudomonas* sp. y *Trichoderma* sp. frente a los otros aislamientos obtenidos.
- El cumplimiento en porcentaje del primer objetivo fué del 100%.
- De los resultados obtenidos con las pruebas de antagonismo se redefine el diseño experimental para el segundo objetivo, el cual será un diseño completamente al azar, un factor (inóculo), ocho niveles (Agua destilada estéril, Peróxido de hidrógeno, *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp., Hongo HR, Bacteria S, Bacteria R y Hongo HR, Bacteria S y R) y tres réplicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castrillon J A, Rodriguez C A. Estimación de la cantidad de grasas y de aceites usados de cocina y su destino en el municipio de Pasto [Tesis]. Pasto: Universidad Cooperativa de Colombia. Facultad de Ingeniería Industrial, 2012.
2. Canales L M. Aislamiento y selección de hongos lipolíticos a partir de aceites vegetales de desecho (proveniente de frituras) utilizados en la elaboración de biodiesel [Tesis]. Lima: Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Mayor de San Marcos, 2010.
3. Chen M, Xu P, Zeng G, Yang C. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. Biotechnol Advances 2015. 33 (6): 745-755.
4. Lemus G, Lau A. Biodegradation of lipidic compounds in synthetic food wastes during composting. Canadian Biosystems Engineering 2002. 44: 33-39.
5. Henao G J, Marquez L Z. Aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos en Colombia [Tesis]. Medellín: Universidad de Antioquia. Facultad de Ingeniería, 2009.

Fecha de recepción: 23/09/15

Fecha de aprobación: 07/10/15

Correspondencia: Vásquez Alarcón Álvaro Eduardo

Email: alvaro.vasquez95@gmail.com