



“Evaluación *in vitro* de la capacidad de remoción orgánica en efluentes de una planta procesadora de aceite de palma aplicando bacterias Gram negativas autóctonas”

Muñoz Gualotuña, Gabriela Alejandra

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

M.Sc. Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo

05 de mayo del 2022



TESIS_Muñoz Gualotuña Gabriela Alejandra_COPYLEAKS.docx

Scanned on: 19:45 May 4, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

| | |
|--------------------------|-----|
| Identical Words | 156 |
| Words with Minor Changes | 86 |
| Paraphrased Words | 156 |
| Omitted Words | 0 |



Escanea el código QR para:
RAFAEL EDUARDO
VARGAS VERDESOTO



Website | Education | Businesses



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: **“Evaluación *in vitro* de la capacidad de remoción orgánica en efluentes de una planta procesadora de aceite de palma aplicando bacterias Gram negativas autóctonas”** fue realizado por la señorita **Muñoz Gualotuña Gabriela Alejandra**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 04 de mayo de 2022

Firma:



Firmado electrónicamente por:
RAFAEL EDUARDO
VARGAS VERDESOTO

.....
Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo, M. Sc.

C.C.: 170820053-8



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Muñoz Gualotuña, Gabriela Alejandra**, con cédula de ciudadanía n°1716190473, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación *in vitro* de la capacidad de remoción orgánica en efluentes de una planta procesadora de aceite de palma aplicando bacterias Gram negativas autóctonas”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 20 de mayo 2022

Firma:

Muñoz Gualotuña, Gabriela Alejandra

C.C.: 171619047-3



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Muñoz Gualotuña, Gabriela Alejandra**, con cédula de ciudadanía n°1716190473, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación *in vitro* de la capacidad de remoción orgánica en efluentes de una planta procesadora de aceite de palma aplicando bacterias Gram negativas autóctonas”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 20 de mayo 2022

Firma:


.....

Muñoz Gualotuña, Gabriela Alejandra

C.C.: 171619047-3

Dedicatoria

A Dios por siempre bendecirme y guiarme.

Este trabajo de titulación, se lo dedico a mi madre por todo el amor incondicional, su esfuerzo, su fortaleza para guiarme y ser partícipe de todo lo que he alcanzado, gracias por todo su sacrificio y ganas de luchar en la vida.

Madre, tú bendición a lo largo de mi vida ha sido fundamental, atesoro tu apoyo tanto moral como psicológico, tu esfuerzo día a día, y tu perseverancia que me han forjado a convertirme en la persona que soy actualmente, gracias por tus enseñanzas y educación.

Te amo mami.

Agradecimiento

DIOS, tu amor, y tus planes no tienen límites, gracias por permitirme alcanzar mis sueños y decir con una sonrisa en el rostro, ¡¡Gracias por tantas bendiciones!!.

Un agradecimiento eterno a mi Universidad y a mis profesores por ser mi *alma mater*, que después de años de esfuerzo, sacrificios, y dedicación, puedo mirar atrás y recordar el camino recorrido para llegar a servir a la sociedad como profesional.

Gracias a mi familia, a mi madre María, a mis hermanos Cecí, Cris, y Luis, ustedes han sido mi soporte y mi ejemplo más grande para llegar a ser quien soy, gracias por ese amor y apoyo incondicional, por enseñarme a luchar por mis sueños y a nunca rendirme a pesar de las circunstancias. Gracias a mi Tío Guillermo, por toda su sabiduría, su amor, y enseñanzas a lo largo de mi vida, por ese rostro alegre y sonriente, que me inspiraban a ser mejor.

A mis tutores, Rafael Vargas, Karina Ponce, y Paul Santana, quienes me permitieron contar con sus consejos y guía en el desarrollo de mi proyecto de investigación, gracias por su tiempo, colaboración y paciencia durante todo el proceso.

Agradezco la oportunidad a la empresa extractora de aceite de palma, por el financiamiento de insumos, equipos e instalaciones para realización del proyecto de titulación, así también su conocimiento y experiencia que me permitió crecer personal y profesionalmente.

Gracias a mis amigos y compañeros, todos hemos aprendido unos de otros en los momentos difíciles y hemos sido equilibrio en los momentos de plenitud, gracias por cada experiencia compartida, y por el apoyo brindado a lo largo de la carrera.

Índice de Contenido

| | |
|---|----|
| “Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de remoción orgánica en efluentes de una planta procesadora de aceite de palma aplicando bacterias Gram negativas autóctonas” | 1 |
| Resultado de análisis de COPYLEAKS..... | 2 |
| Certificación del Director | 3 |
| Responsabilidad de Autoría | 4 |
| Autorización de Publicación | 5 |
| Dedicatoria..... | 6 |
| Agradecimiento | 7 |
| Índice de Contenido | 8 |
| Índice de Tablas | 13 |
| Índice de Figuras | 15 |
| Listado de Abreviaturas | 17 |
| Resumen | 18 |
| Abstract | 19 |
| Capítulo I: Introducción | 20 |
| Antecedentes | 20 |
| Justificación del problema | 21 |
| Objetivos de investigación..... | 22 |
| <i>Objetivo general</i> | 22 |
| <i>Objetivos específicos</i> | 23 |
| Capítulo II: Marco teórico | 24 |
| Generalidades Palma Africana | 24 |
| Botánica y Morfología de la palma de aceite | 24 |
| Composición general del racimo..... | 25 |
| Composición del fruto | 25 |
| Procesos de Extracción de Aceite de Palma | 25 |

| | |
|--|----|
| Recepción..... | 25 |
| Esterilización..... | 26 |
| Desfrutado | 26 |
| Digestión..... | 26 |
| Prensado | 27 |
| Clarificación | 27 |
| Almacenamiento..... | 28 |
| Constituyentes orgánicos | 28 |
| Tratamiento de Efluentes | 29 |
| POME..... | 29 |
| Tratamiento preliminar | 29 |
| Tratamiento primario..... | 30 |
| Tratamiento secundario | 30 |
| Lagunas anaerobias | 30 |
| Lagunas facultativas..... | 32 |
| Lagunas aerobias | 33 |
| Control del sistema de lagunas de estabilización | 33 |
| Temperatura (T)..... | 33 |
| Potencial de hidrógeno (pH) | 33 |
| Oxígeno Disuelto (OD)..... | 34 |
| Demanda Química de Oxígeno (DQO) | 34 |
| Sólidos Totales (ST) | 34 |
| Aceites y grasas (AG)..... | 35 |
| Marco Legal | 35 |
| Biodegradación y biorremediación..... | 35 |
| Microorganismos aislados | 36 |
| Medios de cultivo..... | 36 |

| | |
|--|----|
| Medio MacConkey | 37 |
| Medio Agar Nutriente | 37 |
| Caracterización macroscópica y microscópica | 37 |
| Pruebas bioquímicas de batería corta | 38 |
| <i>Bioaumentación</i> | 38 |
| Capítulo III: Materiales y métodos..... | 39 |
| Zona de estudio..... | 39 |
| Muestreo para análisis físico químico..... | 39 |
| Caracterización fisicoquímica del agua residual | 40 |
| <i>pH y Temperatura (T)</i> | 40 |
| <i>Oxígeno Disuelto (OD)</i> | 40 |
| <i>Demanda Química de Oxígeno (DQO)</i> | 41 |
| <i>Sólidos totales (ST)</i> | 42 |
| <i>Aceites y grasas (AG)</i> | 42 |
| Aislamiento de cepas microbianas | 43 |
| <i>Preparación de medios de cultivo</i> | 43 |
| <i>Muestreo en campo</i> | 44 |
| <i>Muestras para aislamiento de bacterias</i> | 44 |
| <i>Procesamiento de muestras</i> | 45 |
| <i>Obtención de cultivos puros</i> | 45 |
| <i>Caracterización macroscópica del cultivo</i> | 45 |
| <i>Caracterización microscópica de colonias del cultivo</i> | 46 |
| <i>Caracterización bioquímica y de identificación</i> | 46 |
| Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de remoción orgánica..... | 47 |
| <i>Bioaumentación de bacterias</i> | 47 |
| <i>Estándar de McFarland</i> | 47 |
| <i>Pre-ensayo</i> | 48 |

| | |
|--|----|
| <i>Evaluación de la capacidad de remoción orgánica</i> | 48 |
| Análisis estadístico | 49 |
| Capítulo IV: Resultados | 50 |
| Caracterización fisicoquímica del tratamiento de efluentes | 50 |
| Evaluación del muestreo..... | 50 |
| Caracterización fisicoquímica | 51 |
| <i>pH y Temperatura</i> | 53 |
| <i>Oxígeno Disuelto</i> | 54 |
| <i>Demanda Química de Oxígeno</i> | 55 |
| <i>Sólidos Totales</i> | 56 |
| <i>Aceites y grasas</i> | 57 |
| Aislamiento de microorganismos | 59 |
| Evaluación de los puntos de muestreo..... | 59 |
| Muestras procesadas..... | 60 |
| Cultivos puros obtenidos..... | 61 |
| Identificación y Caracterización Bioquímica..... | 63 |
| Caracterización macroscópica y microscópica..... | 63 |
| Caracterización bioquímica..... | 66 |
| Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de remoción orgánica..... | 67 |
| <i>Evaluación de la cinética de crecimiento</i> | 67 |
| <i>Preparación de inóculo bacteriano</i> | 69 |
| <i>Evaluación de la capacidad de remoción orgánica</i> | 71 |
| <i>Diseño experimental</i> | 72 |
| <i>Numeración de cepas bacterianas</i> | 72 |
| <i>Parámetros ambientales (T y pH)</i> | 73 |
| Análisis de la Demanda Química de Oxígeno | 74 |
| Porcentaje de remoción orgánica..... | 75 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| Análisis estadístico..... | 77 |
| Capítulo V: Discusión..... | 82 |
| Capítulo V: Conclusiones..... | 91 |
| Capítulo VI: Recomendaciones..... | 93 |
| Capítulo VII: Bibliografía | 94 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Diseño elaborado para etiquetado de muestras..... | 39 |
| Tabla 2 Pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas..... | 46 |
| Tabla 3 Métodos analíticos empleados en el análisis físico químico de muestras tomadas del sistema de tratamiento de efluentes..... | 51 |
| Tabla 4 Caracterización fisicoquímica en las tres fases que abarca el sistema de tratamiento de efluentes proveniente de la Industria Extractora de Aceite de Palma. | 53 |
| Tabla 5 Datos promedio de pH y T de cada punto muestreado durante cinco meses. | 53 |
| Tabla 6 Resultados de la caracterización fisicoquímica del agua residual de la Industria Extractora de Aceite de Palma empleando métodos analíticos y gravimétricos. | 58 |
| Tabla 7 Resultados de los parámetros ambientales [pH, T] de las muestras tomadas de las lagunas facultativas empleadas para el aislamiento de microorganismos. | 60 |
| Tabla 8 Número de aislados de Bacterias y Levaduras, obtenidos en los medios sólidos, a partir de las muestras de la laguna facultativa L-8. | 62 |
| Tabla 9 Caracterización microscópica y macroscópica de los aislamientos obtenidos en los medios sólidos, a partir de las muestras tomadas de la laguna facultativa L8. | 64 |
| Tabla 10 Pruebas bioquímicas de bacterias Gram negativas y levadura, aislados de la Laguna facultativa perteneciente al Tratamiento de efluentes..... | 66 |
| Tabla 11 Evaluación de las curvas de crecimiento de las cinco bacterias aisladas en el medio líquido denominado caldo nutriente comercial..... | 68 |
| Tabla 12 Resultados promedio del análisis de DQO con diferentes volúmenes de la bacteria <i>Escherichia coli</i> | 70 |
| Tabla 13 Diseño experimental completamente al azar | 72 |
| Tabla 14 Numeración de cepas bacterianas aisladas e identificadas | 72 |

| | |
|--|----|
| Tabla 15 Resultados de temperatura y potencial de hidrógeno determinados durante el ensayo de remoción orgánica. | 73 |
| Tabla 16 Resultados promedio del análisis de la DQO en muestras de efluente industrial, después de la aplicación de los inóculos bacterianos tomados en diferentes tiempos..... | 74 |
| Tabla 17 Resultados del porcentaje de reducción de la DQO..... | 75 |

Índice de Figuras

| | |
|--|--------------------------------------|
| Figura 1 Esquema de digestión anaeróbica de la materia orgánica | 31 |
| Figura 2 Equipos utilizados para la medición <i>in situ</i> de pH, T, y OD..... | 41 |
| Figura 3 Laguna Facultativa N-8 | 44 |
| Figura 4 Toma de muestras | 50 |
| Figura 5 Determinación de pH y temperatura <i>in situ</i> | 50 |
| Figura 6 Datos promedio de T y pH determinados en el tratamiento de efluentes.... | 54 |
| Figura 7 Resultados del comportamiento del OD y T determinados en el tratamiento de efluentes de una extractora de aceite de palma..... | 55 |
| Figura 8 Datos promedio de la demanda química de oxígeno determinado en el tratamiento de efluentes de una extractora de aceite de palma..... | 56 |
| Figura 9 Datos promedio de los sólidos totales determinados en el tratamiento de efluentes de una extractora de aceite de palma. | 56 |
| Figura 10 Datos promedio de aceites y grasas determinados en el tratamiento de efluentes de la extractora de aceite de palma..... | 57 |
| Figura 11 Muestras para el aislamiento de microorganismos (Bacterias)..... | 59 |
| Figura 12 Crecimiento de microorganismos en medio Xilosa, Lisina, Desoxicolato, a partir de muestras de agua residual industrial. | 61 |
| Figura 13 Crecimiento de cultivos puros obtenidos | 63 |
| Figura 14 Porcentaje de Bacterias Gram negativas aisladas de la Laguna Facultativa N8, perteneciente al POME | 67 |
| Figura 15 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> | 68 |
| Figura 16 Curva de crecimiento de <i>Enterobacter cloacae</i> | 68 |
| Figura 17 Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> spp. | ¡Error! Marcador no definido. |
| Figura 18 Curva de crecimiento de <i>Vibrio</i> spp..... | ¡Error! Marcador no definido. |

| | |
|--|----|
| Figura 19 Curva de crecimiento de <i>Aeromonas</i> spp..... | 69 |
| Figura 20 Medición de la densidad celular en el equipo DR 900 | 69 |
| Figura 21 Comportamiento de la DQO, antes y después de la aplicación de diferentes volúmenes (0,3, 5, 8) mL de la bacteria <i>Escherichia coli</i> | 70 |
| Figura 22 Porcentaje de reducción del DQO, después de la aplicación de diferentes volúmenes (3, 5, 8) mL de <i>Escherichia coli</i> , evaluado en cuatro tiempos (0, 24, 48, 72) h..... | 71 |
| Figura 23 Variación del valor de la DQO, transcurridas las 432 h (18 días) en cada una de las cepas | 75 |
| Figura 24 Porcentaje de remoción de la DQO, posterior a la aplicación de cepas con el tratamiento A (volumen de 5 mL) evaluado en cuatro tiempos..... | 76 |
| Figura 25 Porcentaje de remoción de la DQO, posterior a la aplicación de cepas con el tratamiento B (volumen de 8 mL) evaluado en cuatro tiempos..... | 76 |
| Figura 26 Análisis estadístico multivariable (ANOVA) | 77 |
| Figura 27 Prueba Duncan respecto a las cepas..... | 78 |
| Figura 28 Prueba Duncan respecto al volumen y el tiempo..... | 79 |
| Figura 29 Pruebas de interacción para las variables independientes (cepa, volumen, tiempo) y dependiente (%DQO)..... | 80 |

Listado de Abreviaturas

| | |
|-----------------------|--|
| POME | <i>Palm Oil Mill Effluent</i> / Efluentes de las fábricas de aceite de palma |
| RFF | Racimos de Fruta Fresca |
| TEA | Tasa de extracción de aceite de palma |
| DA | Digestión anaeróbica |
| °C | Grados centígrados |
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| DQO | Demanda Química de Oxígeno |
| ST | Sólidos Totales |
| Ton | Tonelada |
| L | Litros |
| mL | Mililitros |
| spp. | Especies |
| TSI | Hierro Triple azúcar |
| H₂S | Sulfuro de Hidrógeno |
| A/A | Pico amarillo/ Fondo amarillo – Superficie ácida/ profundidad ácida |
| K/A | Pico rojo/ Fondo amarillo – Superficie alcalina/ profundidad ácida |
| K/K | Pico rojo/ Fondo rojo – Superficie alcalina / profundidad alcalina. |

Resumen

En este estudio se determinaron las propiedades fisicoquímicas del efluente derivado de la agroindustria de la palma del aceite, obteniéndose en el punto de descarga, parámetros ambientales (pH: 7.2, T: 28.2°C), parámetros químicos [oxígeno disuelto (OD:1.4 mg/L), sólidos totales (ST: 622.5 mg/L), aceites y grasas (AG: 0.0 mg/L) y demanda química de oxígeno (DQO:180 mg/L)], valores que cumplen con la NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTE: RECURSO AGUA. De igual modo, se aislaron 16 bacterias Gram negativas procedentes de lagunas facultativas, y mediante pruebas bioquímicas se identificaron cinco cepas bacterianas correspondientes a *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, y *Vibrio* spp., mismas que se cultivaron en caldo nutriente comercial y se evaluaron *in vitro* la capacidad de remoción orgánica de seis cepas en cinco tiempos (0, 24, 48, 120, 432) h con dos volúmenes (5, 8) mL. Las lecturas se realizaron por duplicado y se sometió a un análisis de varianza (ANOVA). El análisis de la demanda química de oxígeno (DQO) mostró que la adición de 8 mL de la cepa 1 (*Pseudomonas* spp.) en 500 mL de efluente, transcurrido un tiempo de 432h (18 días), provocó cambios significativos (p valor: $0.001 < 0.05$) en el porcentaje de reducción de la DQO con un 62.1%, en comparación con el grupo control, que presentó un porcentaje de reducción de DQO de 26.3%, por tanto, se comprueba que al menos una de las bacterias Gram negativas aisladas sí presentaron capacidad de remoción orgánica en el efluente.

Palabras Clave: Efluente de molino de aceite de palma (POME), tratamiento biológico, análisis microbiológico, demanda química de oxígeno (DQO).

Abstract

In this study, the physicochemical properties of the effluent derived from the oil palm agroindustry were determined, obtaining at the discharge point, environmental parameters (pH: 7.2, T: 28.2°C), chemical parameters [dissolved oxygen (DO: 1.4 mg/L), total solids (ST: 622.5 mg/L), oils and fats (AG: 0.0 mg/L) and chemical oxygen demand (COD: 180 mg/L)], values that comply with the ENVIRONMENTAL QUALITY AND EFFLUENT DISCHARGE STANDARD: WATER RESOURCE. Similarly, 16 Gram-negative bacteria were isolated from facultative lagoons, and by means of biochemical tests five bacterial strains were identified corresponding to *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, and *Vibrio* spp. were identified and cultured in commercial nutrient broth and the organic removal capacity of six strains was evaluated *in vitro* at five times (0, 24, 48, 120, 432) h with two volumes (5, 8) mL. Readings were performed in duplicate and subjected to analysis of variance (ANOVA). Chemical oxygen demand (COD) analysis showed that the addition of 8 mL of strain 1 (*Pseudomonas* spp.) in 500 mL of effluent, after a time of 432h (18 days), caused significant changes (*p* value: 0.001 < 0.05) in the percentage of COD reduction with 62.1%, compared to the control group, which presented a COD reduction percentage of 26.3%, therefore, it is proved that at least one of the isolated Gram-negative bacteria did present organic removal capacity in the effluent.

Key words: Palm oil mill effluent (POME), biological treatment, microbiological analysis, chemical oxygen demand (COD).

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

Las palmas africanas de aceite *Elaeis guineensis* y *Elaeis oleífera*, son una fuente importante de aceite para usos alimentarios humanos, y también para usos industriales secundarios.

En el cantón San Lorenzo, provincia de Esmeraldas existen varias extractoras dedicadas a la extracción de aceite de palma, la empresa objeto de estudio tiene una capacidad de procesamiento de aproximadamente 600 Ton RFF/d, cuya producción de aceite se destina al consumo nacional.

Sin embargo, la transformación y el procesamiento del aceite de palma genera una considerable cantidad de aguas residuales compuesta por sustancias orgánicas e inorgánicas, las mismas que son tratadas en un sistema de tratamiento de aguas residuales, pero su alta producción genera una acumulación de carga orgánica que requiere más procedimientos y estrategias que involucran un gasto mensual adicional, por ello nace la necesidad de implementar tratamientos biológicos como la adición de bacterias con el fin de mejorar la biodegradación de carga orgánica.

La biotecnología ambiental emplea microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) para mejorar la calidad del ambiente y su importancia resulta en que enriquecen la microflora balanceando los ecosistemas microbianos y suprimiendo microorganismos patógenos sin generar subproductos contaminantes (Faife et al., 2018), logrando la limpieza de ambientes contaminados.

Rodriguez Zambrano, (2011). En su trabajo de investigación, "AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS COMO POTENCIALES AGENTES PARA BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES EN UNA EXTRACTORA DE PALMA

ACEITERA". Aisló e identificó cepas de *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*, y *Brevundimona diminuta* del efluente de una extractora de aceite rojo de Palma africana mediante microbiología, y comprobó la capacidad degradadora de cada una, obtuvo que *Brevundimona diminuta* alcanzo una disminución de DQO entre 25 y 40 %.

Vásquez Tarrillo, (2017). En su trabajo de investigación, "DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS EFICIENTES PARA LA REMOCIÓN DEL VALOR DE LA DBO EN LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS DE LA LOCALIDAD DE JEPELACIO – 2016". Evaluó la aplicación de tres dosis de (5, 10, 15) mL de microorganismos eficientes en el agua residual doméstica durante 10 días, transcurrido el tiempo logró una alta remoción del valor de la DBO con la dosis de 10 mL de microorganismos eficientes, siendo la óptima, con un nivel promedio de aceptabilidad de 93,33 % según los Límites Máximos Permisibles para aguas residuales domésticas.

Justificación del problema

El aceite de palma es consumido por cerca de tres mil millones de personas en 150 países. Ecuador es el séptimo país exportador de aceite de palma en el mundo y su producción ha aportado de manera importante a la reducción de pobreza (Ministerio de Comercio Exterior, 2017), pero sus procesos de extracción llevan a la generación de aguas residuales industriales de color marrón que contienen de 0.6 – 0.7 % de aceites, de 2-4 % de sólidos en suspensión, lo que la convierte en una sustancia rica en nutrientes debido al contenido de caroteno, pectina, taninos, fenoles y lignina. Sin embargo, el vertido directo del POME provoca la obstrucción del suelo, mata la vegetación, contamina el agua, y genera olores desagradables. Por tanto, en las dos

últimas décadas se han descrito técnicas biológicas, físicas y químicas como métodos de tratamiento, entre ellos, un nuevo enfoque que incluye la utilización de microorganismos (Mohammad *et al.*, 2021), mismos que son de bajo coste y más eficaces con el fin de mantener los límites máximos permisibles de descarga y garantizar la seguridad del agua y el medio ambiente.

La empresa objeto de estudio, es una empresa dedicada a la extracción de aceite actualmente comprometida con la sustentabilidad ambiental, la realización de esta investigación resulta beneficiosa para la optimización del sistema de tratamiento de efluentes generados de la misma. La investigación involucrará la aplicación de técnicas de microbiología, mediante la cual se aislarán y caracterizarán bacterias autóctonas provenientes del efluente, así también se evaluará *in vitro* la capacidad de remoción orgánica aplicando bacterias Gram negativas aisladas en efluente crudo.

La biorremediación emplea agentes biológicos con hongos, bacterias y levaduras para limpiar o tratar aguas contaminadas y suelos. Tener información acerca de las bacterias Gram negativas autóctonas aisladas del efluente que tengan la capacidad de degradar carga orgánica y su posterior aplicación en campo, permitirá optimizar el proceso de tratamiento biológico, evitando la emanación de olores fuertes y disminuyendo los niveles de Demanda Química de Oxígeno (DQO) en el sistema de tratamiento de efluentes de la extractora aceitera, garantizando el cumplimiento de las normas de descarga del efluente al ambiente.

Objetivos de investigación

Objetivo general

Evaluar *in vitro* la capacidad de remoción orgánica en efluentes de una planta procesadora de aceite de palma aplicando bacterias Gram negativas autóctonas.

Objetivos específicos

1. Efectuar la caracterización fisicoquímica del agua residual proveniente del proceso de extracción de aceite de palma, mediante análisis de la Demanda Química de Oxígeno (DQO), Oxígeno Disuelto (OD), Potencial de Hidrógeno (pH), Temperatura (T), Sólidos Totales (ST), Aceites y grasas (AG).
2. Aislar e identificar las bacterias Gram negativas autóctonas presentes en el sistema de tratamiento de efluentes a través de medios de cultivo selectivos y pruebas bioquímicas.
3. Evaluar *in vitro* la capacidad de remoción orgánica en el agua residual aplicando bacterias Gram negativas autóctonas, mediante análisis de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).

Capítulo II: Marco teórico

Generalidades Palma Africana

La palma de aceite representa el cultivo oleaginoso más importante para la producción de alimentos, es una planta perenne, proveniente de África, la producción mundial de aceite de palma por región según la FAO (2018), ubica a Asia en primer puesto con 88.5 %, seguido de América con 6.8 %, África con 3.8 % y Oceanía con 1 %. Los principales países productores de aceite de palma son Indonesia, Malasia, Tailandia, Colombia, Nigeria, Guatemala, Honduras, Papúa Nueva Guinea, Ecuador y Brasil.

El desarrollo de estas plantas en la zona ecuatorial requiere condiciones climáticas como bosques húmedos tropicales con climas cálidos húmedos con temperaturas entre 24 y 28 °C, requieren de grandes cantidades de agua por ello se hallan en zonas con altas precipitaciones (1800 – 2500)m.m con altitudes entre 0 – 500 ms. n. m.

Las plantaciones de palma se hallan en suelos arcillosos o arenosos con buen contenido de materia orgánica, a la edad de cinco años termina el desarrollo del cultivo, sus siguientes tres años son de producción (cosecha) donde se espera que la palma produzca catorce racimos por año, y tiene una vida económica útil de 25 años (Perez & Rios, 2018).

Botánica y Morfología de la palma de aceite

Botánicamente el nombre científico de la palma africana es *Eleais*, que viene del griego Elaion que significa “oliva”, debido a que posee frutos que contienen grandes cantidades de aceite. Y el nombre específico *guineensis*, dado por el botánico Jacquin que atribuía a la costa de Guinea (Bernal, 2011). El científico Hutchinson ha clasificado a la palma aceitera como:

| | |
|--------------------------------|---|
| Nombre común | Palma aceitera |
| División | Fanerógamas |
| Tipo | Angiosperma |
| Clave | Monocotiledóneas |
| Orden | Palmales |
| Familia | Palmaceae |
| Género | <i>Elaeis</i> |
| Especies | <i>(Elaeis Guineensis) (Elaeis Oleifera) (Elaeis Odora)</i> |
| Híbrido interespecífico | <i>E. Oleífera x E. Guineensis (OxG)</i> |

Composición general del racimo

El racimo está constituido por tres fragmentos, el pedúnculo que es el eje central del racimo donde se desprenden las espigas, las espigas o raquillas que son el soporte donde se encuentran los frutos y los frutos que contienen el aceite y la almendra.

Composición del fruto

El fruto se compone de exocarpio, mesocarpio, endocarpio y endospermo. El exocarpio es el tejido externo del fruto, su consistencia es lisa y brillante, el mesocarpio constituye la pulpa que contiene hasta un 50 % de aceite, el endocarpio o cuesco, es el hueso de la fruta, y el endospermo es la almendra aceitosa (Hartley, 1983).

Procesos de Extracción de Aceite de Palma

Recepción

La operación en toda la fábrica de aceite de palma inicia con la recepción de la fruta, se pesan los racimos de fruta fresca (RFF) provenientes de diversas fincas, y se evalúa su calidad, dicho proceso determina la Tasa de extracción de aceite de palma (TEA) y la calidad del aceite crudo producido. La calidad de RFF se rige por la madurez

del fruto durante la cosecha, donde los frutos maduros contienen más aceite acumulado en las capas del mesocarpio (Chew et al., 2021).

Esterilización

El tratamiento térmico o esterilización, se somete a un calentamiento bajo 40 psig con vapor saturado a 140 °C durante un tiempo entre 70 a 90 min dentro de un recipiente a presión.

Se introduce calor en el fruto (carne de palma) con el objetivo de desactivar la enzima lipasa presente en la capa del mesocarpio que impide el desdoblamiento del aceite y consecuente formación de ácidos grasos libres. Además, facilita el desprendimiento de los frutos de palma del racimo por medio del calor húmedo, proceso donde los materiales lignocelulósicos del mesocarpio se degradan, provocando la rotura de las células oleaginosas. Finalmente tiene como objetivo la deshidratación parcial de la almendra, donde está se encoja y se desprenda de la cáscara, favoreciendo la rotura de la nuez, para su posterior recuperación.

Desfrutado

El desfrutado es un proceso mecánico que separa los frutos del raquis mediante fuerzas centrifugas. El transportador tipo redler, lleva la fruta esterilizada al tambor rotatorio el cual está equipado con paletas, este girará y empezará a desgranar los frutos del racimo. El raquis sale por una banda transportadora hacia el depósito para posteriormente ser trasladado al campo como aporte orgánico, mientras que los frutos sueltos continuarán al proceso de digestión.

Digestión

La digestión es el proceso de liberación del aceite de palma por medio de la descomposición o ruptura de las células. Los frutos sueltos se trituran y golpean en

recipientes cilíndricos con eje rotatorio central, calentados a alta temperatura con el fin de reducir la viscosidad del aceite y facilitar la extracción (en esta forma tiene mayor circulación a través de los pequeños espacios llamados capilares), destruir la cubierta exterior (exocarpio) y completar la ruptura de las células oleosas ((FAO)., n.d.), el producto de la digestión son frutos macerados.

Prensado

El prensado es un proceso continuo que emplea prensas de tornillo sinfín para extraer el aceite de una masa homogénea. La prensa mecánica se encarga de presionar los frutos macerados contra las paredes, ocasionando dos corrientes: una fase líquida que contiene el licor de prensa (aceite, lodos livianos, agua y lodos pesados), que se bombea al tanque de clarificación, en tanto que la fase sólida está compuesta de fibra y nueces, que se seca y se envía a la columna de separación fibra-nuez (Delgado, 2014).

La fibra seca se utiliza como combustible de la caldera para generar vapor de agua en la planta y las nueces se llevan al área de palmistería para secarse en silos con aire caliente.

Clarificación

La clarificación asegura la eliminación de agua, lodo e impurezas del aceite crudo, mediante un proceso de filtrado, decantación y centrifugación. El filtrado separa el aceite de componentes como pedazos de nuez, fibras, arena, lodos livianos y pesados, entre otros.

La clarificación estática del aceite se da por decantación, a una temperatura entre 90 – 95 °C, lo que facilita la separación por densidades, considerando que la densidad del aceite es menor que la del agua, y teniendo en cuenta que el agua y el

aceite son sustancias inmiscibles, las gotas del aceite suben a la superficie y quedan en la parte superior.

Para la clarificación dinámica del aceite, se utiliza un equipo decantador de tres fases denominado tridecanter, que es un equipo centrífugo instalado de manera horizontal, con funcionamiento continuo (Delgado, 2014), con principio de la fuerza centrífuga. El tridecanter cuenta con una sección cilíndrica para la separación del aceite inmiscible en el agua, una sección cónica para secar los sólidos recuperados y un transportador tipo tornillo sinfín para el transporte de estos sólidos fuera del equipo (Fernández, 2018).

Las aguas aceitosas se reprocessan para recuperar el aceite y el resto es enviado a los tanques florentinos, que son la última parte del proceso de extracción y forma parte del tratamiento de efluentes.

Almacenamiento

El aceite crudo es depositado en tanques de almacenamiento que cuentan con serpentines de vapor para mantener una temperatura media de 60 °C, con el fin de preservar la calidad del aceite (Delgado, 2014).

Constituyentes orgánicos

En aguas residuales industriales, la materia orgánica se constituye principalmente de proteínas (40-60 %), carbohidratos (25-50 %), aceites y grasas (8-12 %) (Fuentes et al., 2015). La materia orgánica presente en el agua residual, se determina por pruebas de Demanda Química de Oxígeno, Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) o Carbono Orgánico Total (COT)(Ramalho, 1983).

Tanto la DQO y la DBO, son parámetros de estado de reducción de la materia orgánica, la DBO cuenta la fracción biodegradable mientras que la DQO determina la

fracción no biodegradable. Es importante considerar en un tratamiento los efectos de remoción de sustrato, la DQO y DBO son equivalentes, optando por el análisis de DQO debido a la simplicidad de ejecución, dado que a mayor cantidad de DQO mayor cantidad de contaminante en el agua residual industrial o residuo líquido (Posada & Mosquera, 2007).

Tratamiento de Efluentes

POME

Las aguas residuales de plantas de extracción de aceite de palma, *del inglés Palm Oil Mill Effluent (POME)*, son efluentes agroindustriales de color amarillo-marón con características agresivas:

- ✓ Alta carga orgánica (Promedios):
- ✓ Demanda química de oxígeno (DQO) de 55.000 mg/L.
- ✓ Demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de 25.000 mg/L.
- ✓ Sólidos suspendidos de 20.000 mg/L.
- ✓ Temperatura muy alta: 80 °C.
- ✓ Potencial de hidrógeno (pH) ácido, entre 4 y 5.

En promedio una planta típica produce aproximadamente 0,8 m³ de efluente (POME) por cada tonelada procesada de racimos de fruta fresca (*Fresh Fruit Bunches* o *FFB*, por sus siglas en inglés) (Althausen, 2016).

Tratamiento preliminar

El tratamiento preliminar inicia en los tanques florentinos o también denominados trampas de grasa, dicho proceso recupera el aceite por densidades, teniendo en cuenta que las gotas de aceite son menos densas que el agua, mismas que se ubicarán en la superficie del tanque, serán recogidas por rebose y retornadas al proceso, el tanque

florentino además remueve material sedimentable pesado como arenas y trozos de frutos, por tanto, requiere de una limpieza de lodos periódica.

Tratamiento primario

El tratamiento primario involucra un proceso de filtración, que elimina los sólidos flotantes y sólidos en suspensión de tamaño grande y grueso. Debido a que el tratamiento secundario involucra una población de microorganismos, se opera un sistema de enfriamiento por intermedio de una torre de enfriamiento, obteniendo temperaturas menores a 48 °C.

Tratamiento secundario

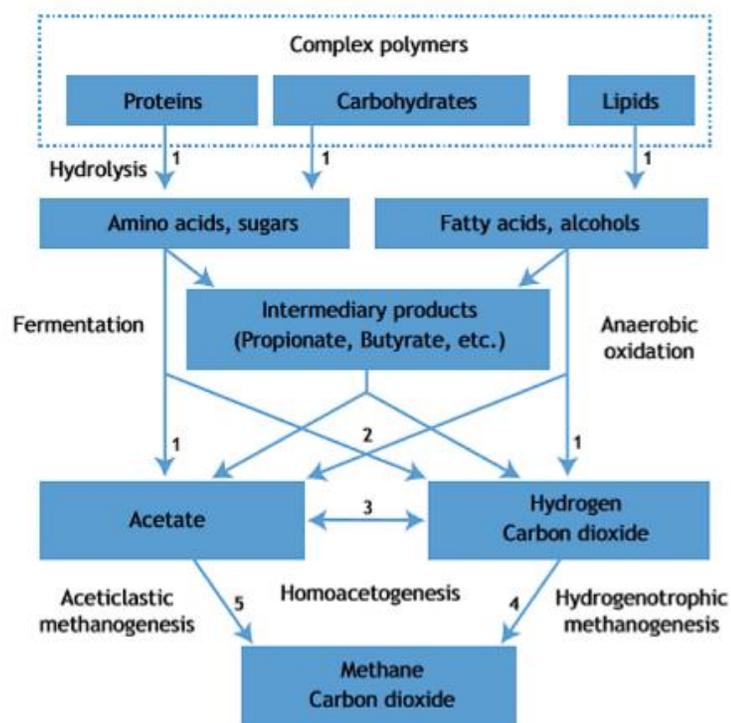
El tratamiento secundario se da por un proceso biológico, donde su principal objetivo es la remoción de compuestos orgánicos biodegradables empleando microorganismos que oxiden biológicamente la materia orgánica. Los procesos biológicos involucran a lagunas anaerobias, facultativas y aerobias.

Lagunas anaerobias

Las lagunas anaerobias son lagunas de tratamiento biológico, relativamente profundas (generalmente de 2,5 a 4,5 metros), funcionan en ausencia de oxígeno, se utilizan con mayor frecuencia para tratar desechos animales de granjas lecheras y porcinas, desechos comerciales o industriales (Pal, 2017), su metabolismo anaerobio involucra una cadena de reacciones, como: la hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Figura 1).

Figura 1

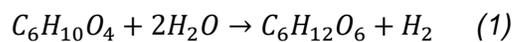
Esquema de digestión anaeróbica de la materia orgánica



Nota: En la digestión anaeróbica (DA) intervienen cuatro procesos: (1) hidrólisis, (2) fermentación (acidogénesis), (3) acetogénesis, y (4) metanogénesis (Lok et al., 2020).

Hidrólisis

La hidrólisis es una reacción en la que se descomponen los componentes de gran masa molecular como lípidos, proteínas, grasas y ácidos nucleicos, que son utilizados por bacterias como fuente de sustrato o alimento, generando estructuras más pequeñas como, por ejemplo, monómeros, aminoácidos y azúcar. La ecuación 1, muestra la descomposición de una grasa a glucosa.



Ácido adípico (Grasa) + Agua → Glucosa (Azúcar) + Hidrógeno

Acidogénesis

La etapa ácido génica involucra la fermentación de azúcares, aminoácidos y ácidos grasos mediante la acción de bacterias fermentativas convirtiéndolos en ácido acético, butírico, hidrógeno (H_2) y dióxido de carbono (CO_2).

Acetogénesis

La acetogénesis utiliza los ácidos como sustrato por bacterias metanogénicas para producir ácidos grasos volátiles y alcoholes, los cuales son oxidados en sustratos metanogénicos como acetato ($C_2H_4O_2$), hidrógeno (H_2), dióxido de azufre (SO_2), y dióxido de carbono (CO_2). Teniendo en cuenta que los productos pueden ser oxidados con una presión parcial de H_2 baja.

Metanogénesis

La metanogénesis o fermentación del metano, se caracteriza por ser una reacción bioquímica lenta, donde el acetato ($C_2H_4O_2$), hidrógeno (H_2), y dióxido de carbono (CO_2) son transformados a metano (CH_4).

Lagunas facultativas

Las lagunas facultativas tienen una profundidad entre 1,2 a 2,4 metros, el mecanismo de remoción y purificación de las aguas residuales ocurre en dos zonas: una zona aerobia y una zona anaerobia.

La zona aerobia se ubica en la parte superior de la superficie que contiene oxígeno debido a la re-aireación atmosférica, misma que favorece una simbiosis entre algas y bacterias donde estas últimas degradan la materia orgánica (MO) utilizando el oxígeno. La zona anaerobia, incluye depósitos de lodo con bacterias anaerobias y facultativas que se encargan de estabilizar la MO (USEPA, 2000b).

Lagunas aerobias

Las lagunas aerobias se caracterizan por presentar pocos sólidos en suspensión, son lagunas poco profundas (generalmente 1 a 1,5 m), que degradan la MO mediante la actividad de bacterias aerobias que consumen el oxígeno suministrado mecánicamente o producido fotosintéticamente por las algas (USEPA, 2000a).

Control del sistema de lagunas de estabilización

Con la finalidad de controlar el comportamiento de las lagunas de estabilización (anaerobias, facultativas y aerobias), es necesario cuantificar los parámetros fisicoquímicos en el laboratorio, tales como:

- ✓ Temperatura
- ✓ Potencial de hidrógeno
- ✓ Oxígeno disuelto
- ✓ Demanda química de oxígeno
- ✓ Sólidos totales
- ✓ Aceites y grasas

Temperatura (T)

La temperatura es una magnitud física que indica la energía interna de un cuerpo, de un objeto o del medio ambiente en general (Graus, 2021). En regiones frías, la temperatura varía de 7 a 18 °C, mientras que en regiones cálidas la variación será de 13 a 30 °C. La temperatura óptima para el desarrollo de la actividad bacteriana está en el rango 25 a 35 °C (Beltrán & Campos, 2016).

Potencial de hidrógeno (pH)

Es un parámetro definido como el logaritmo del inverso de la concentración de hidrogeniones (H^+). Este parámetro indica el grado de acidez que presenta una

sustancia (Gabino, 2018). Las aguas residuales provenientes de las plantas de extracción de aceite de palma, suelen presentar un pH ácido que varía entre 3.5 a 7.3, donde un pH bajo se debe a la presencia de ácidos orgánicos (Wun et al., 2017).

Oxígeno Disuelto (OD)

El Oxígeno Disuelto, del *inglés Dissolved oxygen (DO)*, es la cantidad de oxígeno gaseoso que está disuelto en el agua, entra a través de las olas, turbulencias, y las corrientes, etc. La disponibilidad de más contenido de OD se dará cuando registre una temperatura y salinidad más bajas, juntamente con un mayor movimiento del agua (Rubel et al., 2019). En aguas dulces la solubilidad del OD oscila entre 7 mg/L a 35 °C y 14,6 mg/L a 0 °C.

Para poder metabolizar los alimentos y reproducirse, cada microorganismo debe tener al menos de 0,1 a 0,3 mg/L de OD. En la mayoría de plantas industriales mantienen un OD alrededor de 2 mg/L para que los microorganismos dentro del flóculo puedan obtener oxígeno, y traten adecuadamente los lodos (EMERSON, 2009).

Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) es un parámetro preciso, que determina la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica en una muestra de agua (la biodegradable y la no biodegradable), bajo condiciones específicas de agente oxidante, temperatura y tiempo, este parámetro es usado para determinar la eficacia de la depuración de aguas (Tuset, 2019).

Sólidos Totales (ST)

Sólidos totales es el término aplicado al residuo de material que queda en el recipiente tras la evaporación de una muestra y su posterior secado en un horno a una temperatura definida entre 103 a 105 °C (Vallerie, 2010).

Aceites y grasas (AG)

Los aceites y grasas son compuestos orgánicos constituidos principalmente por ácidos grasos de origen animal y vegetal. Sus características más representativas son baja densidad, poca solubilidad en agua, baja o nula biodegradabilidad (Arce, 2010).

Marco Legal

El Ministerio de Ambiente del Ecuador en el Acuerdo Ministerial N° 097-A, TULSMA, Libro VI, Anexo 1, Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua, establece los parámetros y los valores límites máximos permisibles para la descarga a cuerpos de agua dulce (MAE, 2015).

Biodegradación y biorremediación

La biodegradación es el proceso mediante el cual los organismos microbianos vivos (bacterias, levaduras y hongos), descomponen las sustancias orgánicas en compuestos más pequeños (Joutey et al., 2013). La biodegradación es determinada con pruebas químicas o fisiológicas en recipientes conteniendo cultivos puros de microorganismos, cultivos mixtos o muestras ambientales tales como: agua, suelo o sedimento (Vidali, 2011).

En biología, el término biodegradación se asocia con la biorremediación ambiental. La biorremediación emplea microorganismos, plantas o sus enzimas para degradar/desintoxicar los contaminantes en el medio ambiente (Kulshreshtha, 2012). El fundamento bioquímico de la biorremediación está basado en la cadena respiratoria, donde se produce una serie de reacciones de óxido-reducción para obtener energía.

El proceso de biorremediación utiliza las capacidades de biodegradación de los microorganismos, sin embargo, se puede mejorar implementando técnicas de ingeniería

como la adición de microorganismos (bioaumentación), o mediante bioestimulación donde se agregan nutrientes.

El control y optimización de los procesos de biorremediación involucra factores como la existencia de una población microbiana, disponibilidad de contaminantes para la población microbiana, además de factores ambientales como la temperatura, pH, presencia de oxígeno y nutrientes.

Microorganismos aislados

Los microorganismos pueden ser autóctonos de una zona contaminada o pueden ser aislados de otro lugar y llevados al lugar contaminado (Vidali, 2011). Los microorganismos frecuentemente aislados del POME son *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus* (David et al., 2018), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. (Soleimaninanadegani & Manshad, 2014).

Los microorganismos que participan en la degradación de contaminantes orgánicos como inorgánicos son *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Actinobacteria*, *Alcaligenes*, *Beijerinckia*, *Arthrobacter*, *Methylosinus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Nitrosomonas*, *Rhizoctonia*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Phanerochaete*, *Penicillium*, *Xanthobacter* y *Trametes* (Awasthi et al., 2020).

Medios de cultivo

Los medios de cultivo permiten un crecimiento microbiano rápido de los microorganismos, teniendo en cuenta que dependiendo el tipo de microorganismo que se desee aislar, serán los requerimientos nutricionales, no obstante, de forma general el medio está constituido de agua, una fuente de carbono, fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales (Sood et al., 2011).

Medio MacConkey

Es un medio sólido que permite el aislamiento de bacilos Gram negativos perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, puede usarse para aislar bacilos entéricos como *Aeromonas* spp., y *Plesiomonas* spp., su composición constituye la lactosa como hidrato de carbono fermentable, las sales biliares y el cristal violeta que permiten inhibir el desarrollo de flora Gram positiva (Britania s.a., n.d.).

Medio Agar Nutriente

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de microorganismos con requerimientos nutricionales limitados, su composición se basa en pluripectona y extracto de carne que instituyen la fuente de carbono, y nitrógeno (Britania s.a., 2008).

Se siembra en superficie, inoculando la muestra directamente por el método de estriado, por otro lado, si se siembra en profundidad se inocula una alícuota aplicando el método de dilución o la muestra directamente al medio de cultivo, se homogeniza por rotación y se deja solidificar.

Caracterización macroscópica y microscópica

La tinción Gram es un método empírico para diferenciar las especies bacterianas en dos grandes grupos (Gram positivas y Gram negativas) según las propiedades químicas y físicas de sus paredes celulares (Sutton, 2006). Las bacterias Gram positivas tienen paredes celulares que contienen gruesas capas de peptidoglicano (90% de la pared celular). Éstas se tiñen de color púrpura, mientras que las bacterias Gram negativas tienen paredes con capas finas de peptidoglicano (10% de la pared) y un alto contenido en lípidos, mismas que se tiñen de rosa (Smith & Hussey, 2016).

Pruebas bioquímicas de batería corta

Las pruebas bioquímicas de batería corta engloba a: el citrato donde el microorganismo utiliza el citrato como única fuente produciendo amoníaco debido al consumo de nitrógeno, producto del cual alcaliniza el medio tornando de un color verde a azul, el indol al combinarse con ciertos aldehídos forman un compuesto coloreado, la urea sigue un proceso de hidrólisis con la enzima ureasa que libera moléculas de amoníaco, cambiando el color del medio, finalmente el Agar de Tres azúcares y Hierro (TSI) está compuesto de tres carbohidratos fermentables (glucosa, lactosa y sacarosa), esta prueba permite determinar si la bacteria en estudio tiene la habilidad de fermentar los carbohidratos.

Bioaumentación

La bioaumentación consiste en aumentar el volumen del inóculo bacteriano en estudio. Si un fermentador de producción se inicia con una cantidad pobre de inóculo, el crecimiento se retrasa y la velocidad de formación del producto puede ser insatisfactoria.

Si el número de células no está en el número adecuado, la producción no será adecuada (González, 2018). Además, si crece en condiciones diferentes a como crecerá después, existirá una fase de latencia en el fermentador, reduciendo la rentabilidad.

Capítulo III: Materiales y métodos

Zona de estudio

La presente investigación se realizó en campo y a nivel de laboratorio, misma que se ejecutó en el Laboratorio de Control y Calidad de la empresa objeto de estudio, ubicada en el Cantón San Lorenzo, provincia de Esmeraldas; y en los Laboratorios pertenecientes al Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicada en el Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

Muestreo para análisis físico químico

Las muestras simples se recogieron en frascos de vidrio y de plástico estériles de 1000 mL de color blanco y ámbar para asegurar la calidad de muestra de agua. En el etiquetado de la muestra se registró la fecha, lugar de muestreo, lote o identificación de la muestra, hora de muestreo y el nombre de la persona que realizó el muestreo (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2013). El formato del etiquetado se reporta en la tabla 1, con el cuál se manejó los meses de muestreo.

Tabla 1

Diseño elaborado para etiquetado de muestras

| Etiquetado de muestras | |
|-------------------------------|-----------------|
| <i>Proyecto:</i> | Tesis bacterias |
| <i>ID muestra:</i> | L-12 |
| <i>Lugar:</i> | Salida L-12 |
| <i>Fecha:</i> | 22/11/2021 |
| <i>Hora:</i> | 11:10 a.m. |
| <i>Muestreado por:</i> | Gabriela Muñoz |

Nota: Etiqueta diseñada al efecto de monitoreo de aguas residuales.

El etiquetado de cada muestra mantuvo invariable el nombre del proyecto y la persona responsable del muestreo, las etiquetas como ID muestra, lugar, fecha, hora, variaron según el punto de muestreo.

El lugar escogido para el muestreo fue el sistema de tratamiento de aguas residuales de la Extractora de aceite de palma, se realizaron tres muestreos al azar en la salida de cada laguna (doce), y se monitoreo durante cinco meses. La recolección de la muestra consistió en sumergir el envase 50 cm por debajo de la superficie del agua dirigiendo la boca del recipiente en contra de la corriente.

Caracterización fisicoquímica del agua residual

Los parámetros que se analizaron fueron la Temperatura (T), Potencial de Hidrógeno (pH), Oxígeno Disuelto (OD), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Sólidos totales (ST), Aceites y grasas (AG).

pH y Temperatura (T)

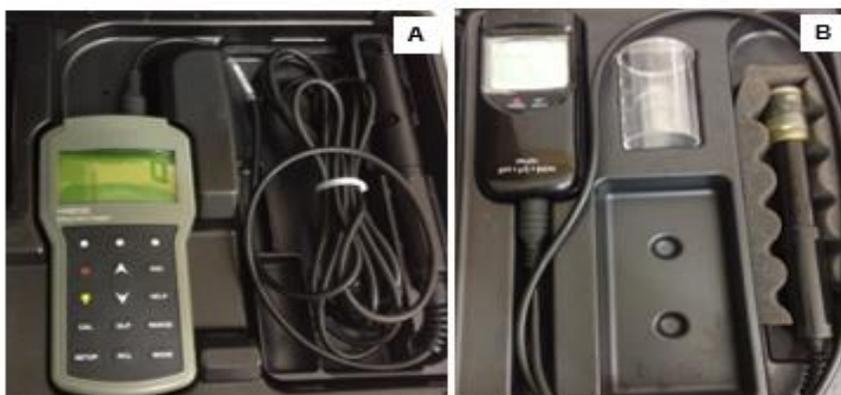
La medición del pH y temperatura se realizó *in situ*, se ocupó el equipo portátil HANNA modelo HI991300, se introdujo directamente los equipos de medición (sonda o termómetro) en el cuerpo de agua y se registró los valores.

Oxígeno Disuelto (OD)

El Oxígeno Disuelto (OD) se midió *in situ*, con el medidor múltiple portátil HANNA modelo HI1991301.

Figura 2

Equipos utilizados para la medición in situ de pH, T, y OD.



*Nota: A: Oxímetro, marca HANNA modelo HI1991301.
B: pH metro, HANNA modelo HI991300.*

Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Para la determinación de la DQO se aplicó el método Hach 8000, llamado digestión por reactor, su procedimiento se basó en encender el termo reactor, se calibró para que se mantenga a 150 °C por 120 min.

Antes de colocar la muestra en el vial de DQO, se preparó usando 2 mL de muestra del agua residual, se colocó en un balón aforado y se aforo con agua destilada a un volumen de 100 mL, se tomó 2 mL de la solución diluida y se vertió en el tubo de reactivo (Vial de DQO), se homogenizaron lentamente por un minuto, y se colocaron en el termo reactor, se dejó por un lapso de 120 min a 150 °C (Guaman, 2015).

La determinación colorimétrica de la muestra consistió en colocar la muestra digestada fría en el colorímetro portátil marca HACH DR 900, se calibró con el blanco (vial que se añadió agua destilada) y se procedió a tomar lectura de los viales digestados.

Sólidos totales (ST)

Los sólidos totales se analizaron por determinación gravimétrica siguiendo el procedimiento implementado en la extractora. Se tomó una muestra de 50 mL de efluente, se colocó en la cápsula de porcelana junto con el algodón y el papel filtro previamente pesados, se registró el valor de la muestra, se procesó en el microondas por 7 min a una potencia de 8 W. Para calcular los sólidos totales, se empleó la ecuación 2.

$$\text{Sólidos totales } \left(\frac{mg}{L} \right) = (A - B) \times 20000 \quad (2)$$

Donde:

$A = \text{Peso cápsula} + \text{papel filtro} + \text{muestra seca (mg)}$

$B = \text{Peso cápsula} + \text{papel filtro (mg)}$

Aceites y grasas (AG)

Los aceites y grasas se determinaron por el método de Extracción Soxhlet. La extracción, se realizó con cloroformo a partir de la muestra seca que se usa para determinar sólidos totales (Rodríguez, 2011). El procedimiento se basó en pesar el balón aforado, se ubicó la muestra seca y el cloroformo dentro de la camisa de vidrio, y se montó en el equipo Soxhlet, el tiempo estimado a extracción fue aproximadamente de 30 a 45 min, mismo que depende del contenido de aceites. Un indicativo de la extracción completa del aceite es cuando el papel filtro se torna de color amarillo a blanco y el solvente en la camisa se muestra incoloro. El solvente es retirado a un recipiente de almacenamiento, mientras que, el balón con el aceite se colocó en la estufa por aproximadamente un tiempo de 120 min a una temperatura de 105 °C, una vez terminado el proceso, se dejó enfriar el balón y se registró el peso. Para calcular los aceites y grasas, se empleó la ecuación 3.

$$\text{Aceites y grasas } \left(\frac{mg}{L}\right) = (A - B) \times 20000 \quad (3)$$

Donde:

A = Peso balón + aceite (mg)

B = Peso balón vacío (mg)

Aislamiento de cepas microbianas

Preparación de medios de cultivo

El objetivo de este estudio fue aislar bacterias Gram negativas, por tanto, los medios que se utilizaron fueron: Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD), Agar MacConkey, Agar Nutriente.

El Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato XLD se preparó agregando 57g en un litro de agua destilada estéril, se agitó suavemente y se sometió a ebullición, este medio no se esterilizó, por lo que se dejó enfriar y se vertió en placas de Petri.

El Agar MacConkey (*W/CV, NaCl, 0.15% BILE SALTS & 1% LACTOSA*), se suspendió los 51,55 gramos del medio en un litro de agua destilada estéril. Se mezcló bien con agitación frecuente y se dejó hervir durante un minuto, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Una vez esterilizado, se dejó enfriar hasta lograr un medio líquido tibio, y se dispuso en recipientes apropiados (Caja de Petri).

El Agar Nutritivo es un medio de cultivo para recuento y aislamiento de microorganismos, se preparó agregando 23 g en un litro de agua destilada estéril, se agitó suavemente, se dejó reposar cinco minutos y se sometió a ebullición, se dejó enfriar y se vertió en placas de Petri.

Muestreo en campo

Se tomó cuatro muestras; dos en la salida y entrada de la laguna anaerobia N-8 (Figura 3); se utilizó recipientes estériles de boca ancha con tapa rosca, para evitar contaminación en la muestra, se maniobró con material de protección personal como guantes, mandil y mascarilla, y previamente se rotulo los frascos con el lugar, fecha, hora de recolección, identificación de muestra y responsable.

Figura 3

Laguna Facultativa N-8



Nota: Laguna facultativa N-8, establecida para la toma de muestras con el fin de aislar bacterias.

Las muestras fueron procesadas directamente en el campo para obtener flora fresca y confiable pues según la Junta Andalucía, (2018) en los procesos de refrigeración y transporte existe una modificación de flora bacteriana o degradación biológica, por tanto se recomienda sembrar directamente las muestras en el lugar de recolección.

Muestras para aislamiento de bacterias

Se recolecto por duplicado, 50 mL de muestras líquidas y 20 mL de muestras sólidas de la laguna facultativa N-8 del sistema de tratamiento de efluentes de la

extractora de aceite de palma. Además, se realizó *in situ* la inoculación de las muestras líquidas y sólidas con un hisopo estéril en cajas de Petri con Agar MacConkey.

Procesamiento de muestras

Las muestras se inocularon en medios de cultivo, 45 min después de la recolección debido a la distancia entre el sistema de tratamiento y el laboratorio. La siembra se ejecutó por la técnica de agotamiento por estrías en dos cajas de Petri con medio Agar Nutritivo, dicho proceso se efectuó con palillos e hisopos estériles en un mesón previamente desinfectado y cerca de los mecheros (al menos tres).

El procedimiento consistió en cargar el palillo con la muestra, se inició haciendo estrías paralelas en la cuarta parte de la superficie de la placa, se quemó el palillo, se giró la placa a 90°, se volvió a estriar tocando 3 o 4 veces el área sembrada inicialmente y se cubrió otro cuarto de la placa. Finalmente, sin quemar el palillo, se estrió el resto de la superficie de la caja de Petri.

Las placas sembradas se ubicaron en posición invertida (con el medio de cultivo arriba), evitando de esta manera que el agua de condensación caiga sobre el medio (Checa, 2018) y se dejó incubar a 30 °C, entre 48 a 72 horas (Prato et al., 2019).

Obtención de cultivos puros

Para la obtención de cepas bacterianas puras, se resembró una colonia en un nuevo medio estéril por la técnica de estriado o agotamiento en placa. Se dejó incubar a 30 °C por 12 horas.

Caracterización macroscópica del cultivo

La caracterización macroscópica permitió describir la morfología de las cepas bacterianas obtenidas como es la forma (circular, filamentosa, irregular, puntiforme,

rizoide), elevación (plana, convexa, pulvinante), borde (liso o irregular), color y aspecto (opaca, mucosa, brillante).

Caracterización microscópica de colonias del cultivo

La caracterización microscópica se efectuó con el fin de evitar errores en la observación, se realizó tinción Gram, en dos placas por cada cultivo puro aislado, se observó las placas teñidas en un microscopio óptico, con un aumento de 100X, finalmente se procedió a inocular en tubos de ensayo con caldo nutritivo.

Caracterización bioquímica y de identificación

Las pruebas bioquímicas se realizaron utilizando el protocolo descrito por (TMCC, 2021). Se aislaron y purificaron en medio diferencial MacConkey, se realizaron 7 pruebas bioquímicas para la identificación de cada bacteria (Tabla 2).

Tabla 2

Pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas

| Prueba | Medio de cultivo | Resultado | |
|-----------------------|--|--|---|
| | | Positivo | Negativo |
| <i>Motilidad</i> | SIM | Difuminación de la bacteria hacia los lados | La bacteria sólo crece en la línea de inoculación |
| <i>Catalasa</i> | 1 gota de H ₂ O ₂ en una colonia | Efervescencia | Permanece igual |
| <i>Indol</i> | SIM 3 gotas de Reactivo de Kovács | Rojo (anillo) | Amarillo |
| <i>H₂S</i> | Agar de Tres azúcares y Hierro (TSI) | Negro | Color del medio de cultivo se queda igual |
| <i>Urea</i> | Agar Urea | Rosado | Amarillo |
| <i>Citrato</i> | Citrato Simmons | Azul | Verde |
| <i>TSI</i> | Agar de Tres azúcares y Hierro (TSI) | Utilización de Glucosa: Rojo/Amarillo Utilización de Lactosa: Amarillo/Amarillo | Utilización de Peptonas: Rojo/Rojo |

Nota: Resultados positivos y negativos de las pruebas bioquímicas (Brown & Smitt, 2003).

Se cultivaron en pruebas bioquímicas de urea, citrato, triple azúcar hierro (TSI) e indol. Para lo cual, se tomó una colonia del medio y se inoculó en la superficie del agar urea inclinado, se dejó incubar de 18 – 24 horas a una temperatura de 35 °C.

Para citrato se tomó una colonia aislada del medio, se inoculó en forma de estría única en el pico de flauta del tubo de agar citrato, se incubo entre 24 a 48 horas (con tapa floja) a una temperatura de 35 °C.

Triple azúcar hierro (TSI) se sembró picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del medio e incubando a 35 °C por 24 horas. Para determinar Indol, se tomó una colonia y se introdujo el palillo recto en el tubo (en el centro) adicionando de 3 o 4 gotas (200 uL) de reactivo de Kovacs al tubo. El medio se incubo de 18 a 24 horas a una temperatura de 35 °C, se observó la movilidad, la producción de sulfhídrico y finalmente la producción de indol a partir del triptófano.

Evaluación *in vitro* de la capacidad de remoción orgánica

Bioaumentación de bacterias

Para la masificación de bacterias se utilizó caldo nutriente comercial (Nutrient Broth), el medio líquido se esterilizo a 121 °C y 1 atm de presión para garantizar la asepsia del medio. Cada bacteria fue inoculada en Agar MacConkey por el método de estriado, se dejó incubar a 30 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se tomó una colonia y se colocó en diferentes volúmenes de Caldo previamente preparados.

Estándar de McFarland

El estándar de McFarland permite conocer el número de bacterias por mililitro, también denominada UFC/mL. Para preparar la suspensión bacteriana, se inoculó el cultivo en Agar MacConkey, se incubo a 30 °C durante 24 horas. Posteriormente se raspó la biomasa de la superficie del medio para colocar en volúmenes diferentes de

agua destilada, para la medición de la biomasa se empleó la técnica de la densidad óptica (OD), la selección de la longitud de onda se dio a 560 nm, teniendo en cuenta que (Becker et al., 1996), mencionan que para determinar la densidad celular es recomendable emplear longitudes de onda entre 400-600 nm.

Pre-ensayo

Se realizó un Pre-ensayo de una bacteria tomada al azar, se elaboró volúmenes de (3, 5, 8) mL para dispensarlas en 500 mL de efluente crudo tomado de la laguna L-1, se colocaron y homogenizaron en matraces, se monitoreo en tres tiempos (24, 36 y 48) horas, con el objetivo de fijar únicamente dos dosis de suspensión bacteriana a trabajar en un futuro, teniendo en cuenta que el control del pre-ensayo sería los 500 mL del efluente adicionando volúmenes de (3, 5, 8) mL de agua destilada estéril.

Evaluación de la capacidad de remoción orgánica

Se efectuó un análisis de DQO a las muestras que contenían la bacteria en estudio en cinco tiempos: 0, 1, 2, 5 y 18 días con el fin de evaluar la disminución de carga orgánica en el efluente. Para la determinación de la DQO se usó la ecuación 5.

$$DQO \left(\frac{mg}{L} \right) = \text{Lectura del colorímetro} \times F_d \quad (4)$$

$$DQO \left(\frac{mg}{L} \right) = \text{Lectura del colorímetro} \times \frac{100}{\text{Muestra diluida}} \quad (5)$$

Donde:

F_d : Factor de dilución.

La lectura del colorímetro se llevó a cabo con el equipo DR 900, eligiendo según el requerimiento, los programas 435 DQO RA, y 432 DQO Mn III correspondientes al DQO de rango alto establecido en un valor de 200 a 15000 mg/L, y DQO de rango medio con un valor entre 0 a 1500 mg/L.

Reducción de la DQO (% R-DQO) utilizando bacterias Gram negativas

Para conocer el porcentaje de reducción de la DQO que perpetro la bacteria frente a la muestra del efluente, se aplicó la ecuación 6.

$$\% R - DQO = \frac{DQO_i - DQO_f}{DQO_i} \times 100 \quad (6)$$

Donde:

DQO_i : valor inicial de la Demanda Química de Oxígeno.

DQO_f : valor final de la Demanda Química de Oxígeno.

Análisis estadístico

El modelo experimental que se llevó a cabo fue un análisis estadístico ANOVA (Análisis de varianza), que permitió comparar simultáneamente todas las medias, este estadístico utilizó pruebas de hipótesis, una hipótesis nula y una alternativa que fueron aceptadas o rechazadas según el p valor, con un intervalo de confianza del 95 % ($\alpha=0.05$). Se estableció las siguientes hipótesis:

- H_0 : Las bacterias Gram negativas autóctonas aisladas y aplicadas *in vitro*, remueven eficientemente la carga orgánica presente en el efluente proveniente de la planta procesadora de aceite de palma.
- H_1 : Las bacterias Gram negativas autóctonas aisladas y aplicadas *in vitro*, no remueven eficientemente la carga orgánica presente en el efluente proveniente de la planta procesadora de aceite de palma.

Se seleccionó este método debido al manejo de la variable dependientes denominado porcentaje de reducción del DQO (%DQO), este método permitió determinar si existe o no influencia de la variable independiente (cepas obtenidas, volumen, tiempo) sobre la dependiente (porcentaje de reducción del DQO). El criterio de aceptación o rechazo de las hipótesis dependió del valor-p o significancia, con un intervalo de confianza del 95 % ($\alpha=0.05$); es decir, si el valor-p > α se acepta la hipótesis nula y si el valor-p < α la hipótesis nula se rechaza.

Capítulo IV: Resultados

Caracterización fisicoquímica del tratamiento de efluentes

Evaluación del muestreo

El tratamiento de efluentes se encuentra a la intemperie, constituido por doce lagunas, se ejecutó el muestreo de efluentes en la salida de cada laguna (Figura 4), durante los meses de julio, agosto, septiembre, octubre y noviembre del 2021.

Figura 4

Toma de muestras

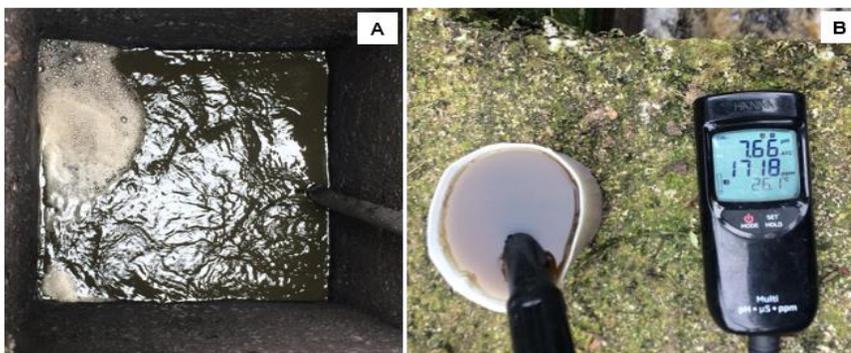


Nota: **A:** Punto de descarga (Laguna L-12). **B:** Toma de muestras líquidas.

El jueves 21 de octubre del 2021, presento una temperatura de 26.1 °C, y un pH de 7.66 (U pH) en la laguna facultativa N-8 (Figura 5).

Figura 5

Determinación de pH y temperatura in situ.



Nota: **A:** cámara de reparto (Laguna L-8). **B:** determinación *in situ* de pH y T.

Caracterización fisicoquímica

Los análisis fisicoquímicos llevados a cabo se separaron en dos grupos: Agentes Físicos (Temperatura, Sólidos totales), y Agentes Químicos (pH, Oxígeno Disuelto, Demanda Química de Oxígeno, Aceites y grasas). El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Control y Calidad de la empresa objeto de estudio, la Tabla 3 menciona los métodos que se emplearon para la determinación de cada parámetro físico químico.

Tabla 3

Métodos analíticos empleados en el análisis físico químico de muestras tomadas del sistema de tratamiento de efluentes.

| Parámetro | Método analítico | Unidad |
|----------------------------------|--|--------|
| Temperatura (T)* | Standard Methods Ed. 23, 2017, 2550 B / Termómetro | °C |
| Potencial de hidrógeno (pH)* | Standard Methods Ed. 23, 2017, 4500-H+ A y 4500-H+ B / Método electrométrico | pH |
| Demanda Química de Oxígeno (DQO) | Standard Methods Ed. 23, 2017, 5220 D / HACH Método 8000 | mg/L |
| Oxígeno Disuelto (OD) | Standard Methods Ed. 23, 2017, 4500-O G / Método del electrodo de membrana | mg/L |
| Sólidos Totales (ST) | Standard Methods Ed. 23, 2017, 2540 B / Gravimetría | mg/L |
| Aceites y Grasas (AG) | Standard Methods Ed. 23, 2017, 5520 / Gravimetría | mg/L |

Nota: Métodos analíticos empleados para análisis de muestras (Public & Health Association (APHA), 1990).

El tratamiento de efluentes está dividido en tres fases; la primera fase es anaerobia acetogénica que abarca las seis primeras lagunas ($L_1 - L_6$), la segunda fase es anaerobia facultativa que engloba a lagunas ($L_7 - L_9$), finalmente la fase aerobia contiene a las lagunas ($L_{10} - L_{12}$).

En la fase anaerobia acetogénica, se da una reacción de hidrólisis donde se fragmentan los compuestos orgánicos complejos como los desperdicios del procesamiento del aceite de palma; fibra, lodos, aceites y grasas en ausencia de oxígeno, este proceso se cumple en las lagunas $L_1 - L_2$. La fase acidogénica ocurre en las lagunas L_3-L_4 , donde los monómeros se degradan en ácidos orgánicos como el ácido acético e hidrógeno. La laguna L_5 , sigue una fase acetogénica convirtiendo los ácidos orgánicos en alcoholes los cuales son oxidados en sustratos metanogénicos como el acetato, dióxido de carbono e hidrógeno. La laguna L_6 , efectúa la fermentación del metano mediante la ayuda de bacterias metanogénicas y bacterias anaerobias estrictas.

En las lagunas L_7, L_8, L_9 , se cumple un proceso anaerobio facultativo, en el cual se remueve la materia orgánica por acción biológica de las bacterias de forma anaerobia como anaerobia. Finalmente, las lagunas L_{10}, L_{11}, L_{12} , son lagunas aerobias que se usan para la producción de algas, separación de los lodos y aireación de manera natural donde el oxígeno es provisto de la fotosíntesis.

Una vez reconocido y estudiado el sistema de tratamiento de efluentes, se estableció las salidas de cada laguna como punto de muestreo, debido a la facilidad de acceso, cámaras de repartición de efluentes abiertos con profundidades entre 1 a 1,5 m.

La Tabla 4, muestra los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos registrados en el procesamiento de muestras tomadas del tratamiento de efluentes, divididas por cada fase de estudio, desde el mes de julio hasta el mes de noviembre del 2021.

Tabla 4

Caracterización fisicoquímica en las tres fases que abarca el sistema de tratamiento de efluentes proveniente de la Industria Extractora de Aceite de Palma.

| Parámetros | Efluente | I Fase (L1 - L6) | II Fase (L7 - L9) | III Fase L10 - L12) | Unidad |
|----------------------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------|
| Temperatura (T) | 57,72 | 30,15 | 28,26 | 28,18 | °C |
| Potencial de hidrógeno (pH) | 4,01 | 4,71 | 6,30 | 7,17 | pH |
| Demanda química de oxígeno (DQO) | 44800 | 10003 | 2829 | 180 | mg/L |
| Oxígeno Disuelto (OD) | 1,06 | 1,03 | 0,95 | 1,44 | mg/L |
| Sólidos Totales (ST) | 61100 | 11775 | 7850 | 623 | mg/L |
| Aceites y Grasas | 8075 | 2750 | 775 | 0 | mg/L |

Nota: datos obtenidos en el laboratorio de control y calidad de la empresa extractora de aceite de palma.

A continuación, se detalla los valores determinados en cada parámetro físico químico establecido al inicio de la investigación.

pH y Temperatura

La Tabla 5, detalla los datos promedio del comportamiento de la temperatura y el pH determinados *in situ*, desde la entrada del florentino (trampa de grasas) hasta la salida de laguna N-12, sitio señalado como punto de descarga al cuerpo de agua dulce (río).

Tabla 5

Datos promedio de pH y T de cada punto muestreado durante cinco meses.

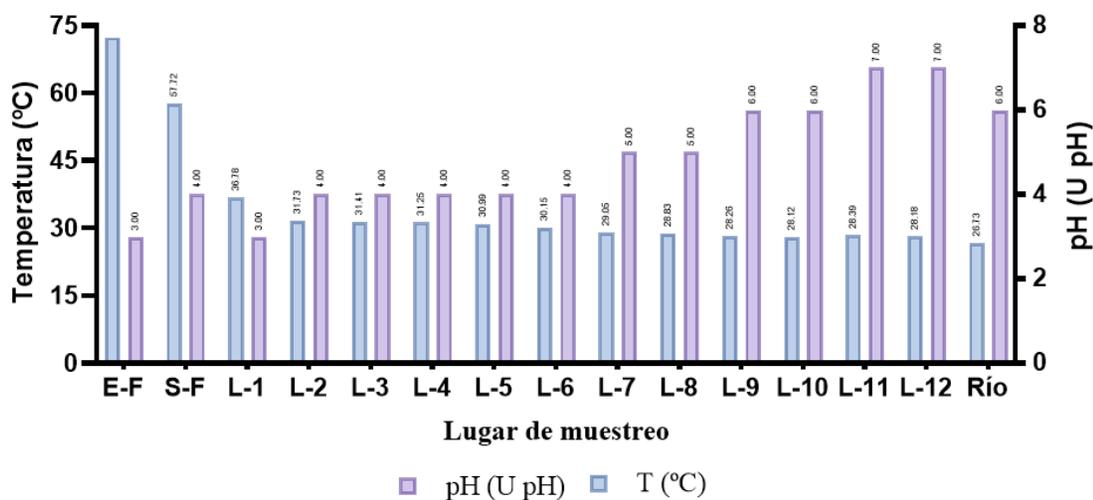
| Lugar de muestreo | T-[Salida] | pH-[Salida] | Lugar de muestreo | T-[Salida] | pH-[Salida] |
|--------------------------|-------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|
| <i>E-Florentino</i> | 72,38 | 3,93 | <i>Laguna 6</i> | 30,15 | 4,71 |
| <i>S-Florentino</i> | 57,72 | 4,01 | <i>Laguna 7</i> | 29,05 | 5,05 |
| <i>Laguna 1</i> | 36,78 | 3,61 | <i>Laguna 8</i> | 28,83 | 5,60 |
| <i>Laguna 2</i> | 31,73 | 4,22 | <i>Laguna 9</i> | 28,26 | 6,30 |
| <i>Laguna 3</i> | 31,41 | 4,16 | <i>Laguna 10</i> | 28,12 | 6,83 |
| <i>Laguna 4</i> | 31,25 | 4,46 | <i>Laguna 11</i> | 28,39 | 7,08 |
| <i>Laguna 5</i> | 30,99 | 4,59 | <i>Laguna 12</i> | 28,18 | 7,17 |

Nota: Resultados procesados *in situ* en el tratamiento de efluentes de la empresa extractora de aceite de palma.

La figura 6, muestra los datos promedio de la temperatura y el pH determinados *in situ*, en las salidas cada una de lagunas que conforman el sistema de tratamiento de efluentes de la fábrica de aceite de palma durante los meses de julio, agosto, septiembre, octubre, y noviembre del 2021.

Figura 6

Datos promedio de T y pH determinados en el tratamiento de efluentes



Nota: Resultados procesados *in situ* en el tratamiento de efluentes de una extractora de aceite de palma. Imagen creada en GraphPad Software.

El florentino o trampa de grasas es el punto de ingreso al sistema, donde la temperatura varía en un intervalo (53 - 74 °C) con un pH entre (3.5 - 4.5); mientras que la laguna N-12 es el punto de descarga o salida del efluente al cuerpo de agua dulce con una temperatura y pH promedio de 28.18 y 7.17 respectivamente.

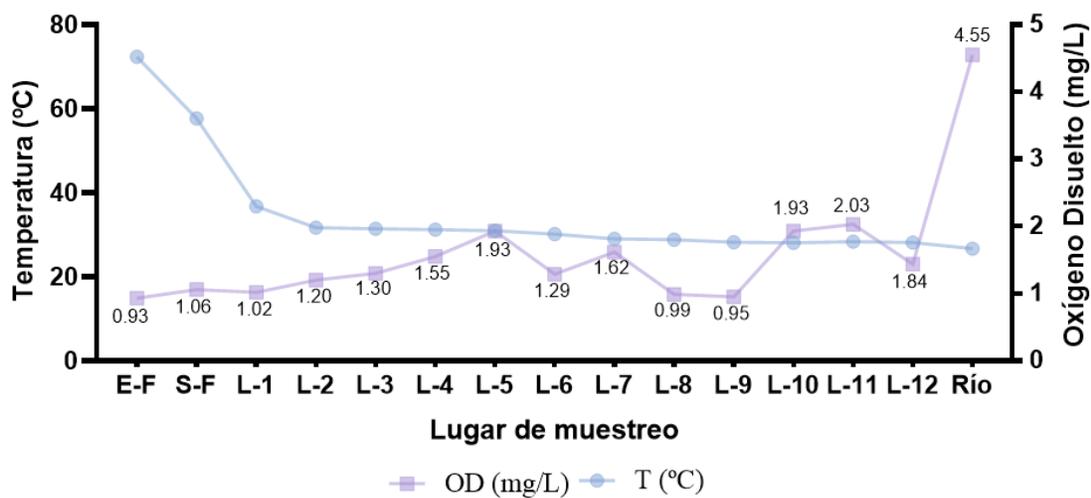
Oxígeno Disuelto

La figura 7, muestra la influencia de la temperatura en el comportamiento del OD, en el ingreso del sistema reporta una temperatura promedio de 72.40 °C con un OD promedio de 0.93 mg/L; en la salida de la laguna N-12 presenta una temperatura

promedio de 28.20 °C con un OD promedio de 1.84 mg/L, mientras que en el río se registra un OD de 4.55 mg/L con una temperatura de 26.70 °C.

Figura 7

Resultados del comportamiento del OD y T determinados en el tratamiento de efluentes de una extractora de aceite de palma.



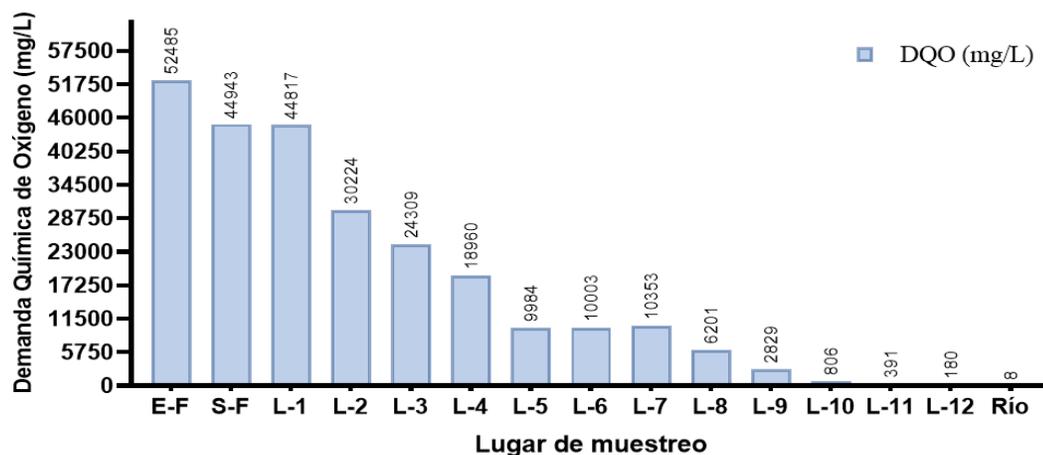
Nota: Imagen creada en GraphPad Software.

Demanda Química de Oxígeno

La figura 8, evidencia el comportamiento del DQO a lo largo del sistema, en el ingreso alcanza un valor promedio de 44800 mg/L; al término de la fase I, registra un valor de 10003 mg/L, en la fase II reporta un valor de 2829 mg/L, y en la salida de la laguna N-12 se logró un valor promedio de 180 mg/L, obteniendo un porcentaje de remoción de DQO de 99.60 %, mientras que aguas abajo de la descarga, a 100 m del río se registra un DQO de 8 mg/L.

Figura 8

Datos promedio de la demanda química de oxígeno determinado en el tratamiento de efluentes de una extractora de aceite de palma.

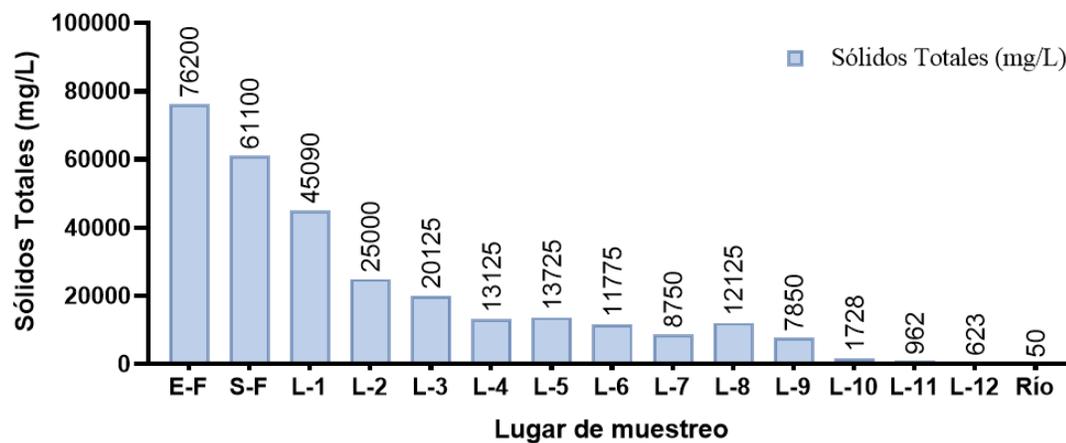


Nota: Imagen creada en GraphPad Software.

Sólidos Totales

Figura 9

Datos promedio de los sólidos totales determinados en el tratamiento de efluentes de una extractora de aceite de palma.



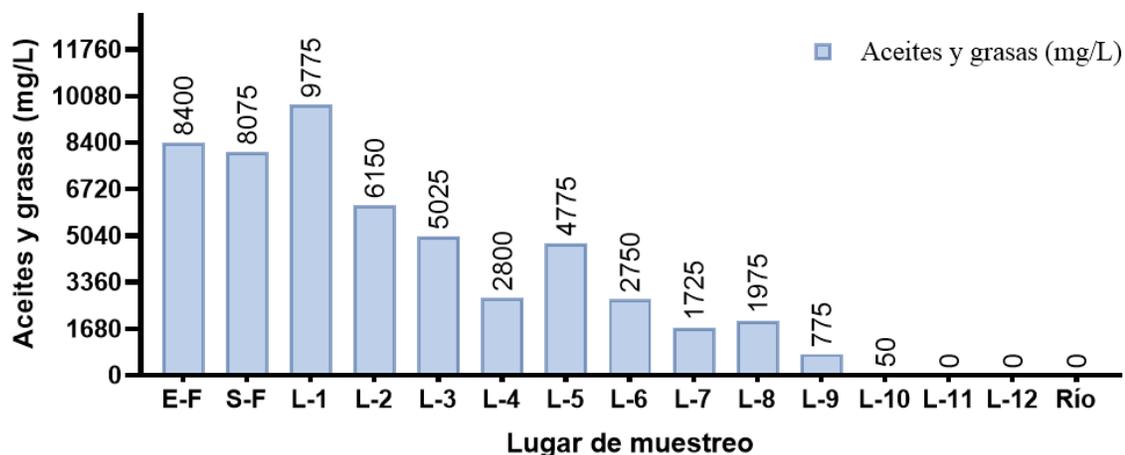
Nota: Imagen creada en GraphPad Software.

La figura 9, evidencia la presencia de Sólidos totales a lo largo del sistema, en el ingreso alcanza un valor promedio de 61100 mg/L; al término de la fase I, registra un valor de 11775 mg/L, en la fase II reporta un valor de 7850 mg/L, y en la salida de la laguna N-12 se logró un valor promedio de 623 mg/L, mientras que aguas abajo de la descarga, a 100 m del río se registra un valor promedio de 50 mg/L de ST.

Aceites y grasas

Figura 10

Datos promedio de aceites y grasas determinados en el tratamiento de efluentes de la extractora de aceite de palma.



Nota: Imagen creada en GraphPad Software.

La figura 10, evidencia la presencia de aceites y grasas a lo largo del sistema, en el ingreso alcanza un valor promedio de 8075 mg/L; al término de la fase I, registra un valor de 2750 mg/L, en la fase II reporta un valor de 775 mg/L, en la salida de la laguna N-12 hubo ausencia de grasas dando 0 mg/L, y aguas abajo de la descarga a 100 m del río se registra un valor promedio de 0 mg/L de AG.

Los resultados promedios de la caracterización fisicoquímica del punto de descarga (Laguna 12) al cuerpo de agua dulce, monitoreados desde el mes de julio

hasta finales del mes de noviembre del 2021, se compararon con los límites máximos permisibles de la Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua, con el fin de verificar el cumplimiento de la norma, misma que se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Resultados de la caracterización fisicoquímica del agua residual de la Industria Extractora de Aceite de Palma empleando métodos analíticos y gravimétricos.

| Parámetros | Agua Residual Industrial | TULSMA | Unidad | Cumplimiento de la Normativa |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------|---------------|-------------------------------------|
| Temperatura (T) | 28,2 | <35 | °C | Si cumple |
| Potencial de hidrógeno (pH) | 7,2 | 5 - 9 | pH | Si cumple |
| Demanda química de oxígeno (DQO) | 180,0 | 200 | mg/L | Si cumple |
| Oxígeno Disuelto (OD) | 1,4 | - | mg/L | No requerido |
| Sólidos Totales (ST) | 622,5 | 1600 | mg/L | Si cumple |
| Aceites y Grasas (AG) | 0,03 | 30 | mg/L | Si cumple |

Nota: los datos obtenidos fueron comparados con la Norma de calidad ambiental.

Contrastando los datos obtenidos de la caracterización fisicoquímicas del punto de descarga con los límites permisibles establecidos en la Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua, los parámetros fisicoquímicos determinados en la descarga del efluente en el cuerpo de agua dulce cercano la empresa objeto de estudio si cumplen con T, pH, DQO, ST, y AG, en el caso del OD, no es un parámetro requerido de cumplimiento ambiental, pero se monitoreo para tener un conocimiento actual del nivel de saturación de oxígeno que presenta cada laguna que conformaba el sistema de tratamiento de efluentes.

Aislamiento de microorganismos

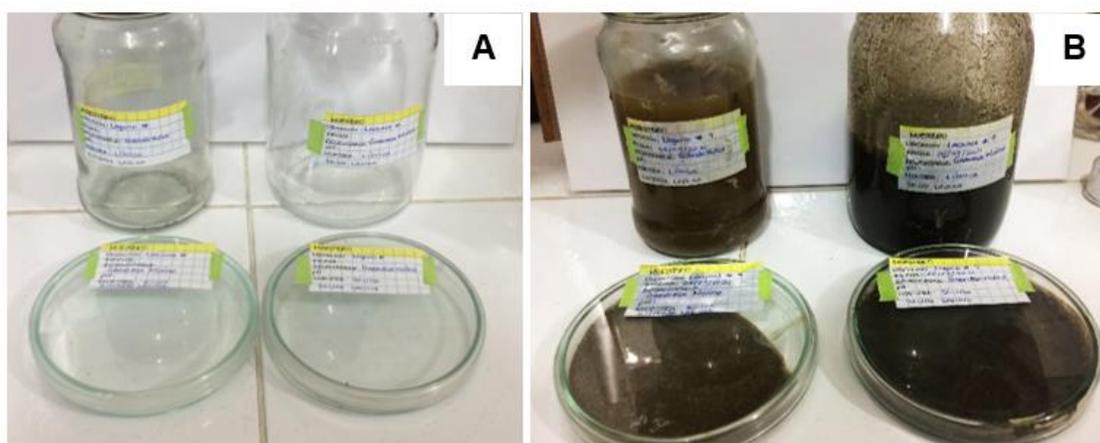
Para el aislamiento de los microorganismos se recogieron muestras líquidas y muestras sólidas. Las muestras líquidas se tomaron de la laguna facultativa L-8 del sistema de tratamiento de efluentes de la extractora de aceite de palma, esta posee un área de 2229 m^3 con una profundidad de 1,5 m.

Evaluación de los puntos de muestreo

Las muestras sólidas se tomaron de la superficie de la laguna facultativa L-8, en dos puntos de muestreo ubicados en entrada y la salida de la laguna utilizando recipientes estériles. Las muestras de agua residual se caracterizaron por presentar una coloración gris oscuro, con presencia de olor, las muestras sólidas presentaron un color café oscuro (Figura 11).

Figura 11

Muestras para el aislamiento de microorganismos (Bacterias)



Nota: A: material estéril de vidrio rotulado. *B:* muestras líquidas y sólidas tomadas de la L8.

La Tabla 7, detalla que las muestras de agua residual presentaron diferencias en los valores de pH, sin embargo, todas las muestras presentaron un pH ligeramente

ácido, con un valor promedio de pH = 5,51 para las muestras líquidas y un pH = 5,67 para las muestras sólidas.

Tabla 7

Resultados de los parámetros ambientales [pH, T] de las muestras tomadas de las lagunas facultativas empleadas para el aislamiento de microorganismos.

| Muestras | Potencial de Hidrógeno (pH) | Temperatura (T) |
|--------------------------|------------------------------------|------------------------|
| <i>Muestras líquidas</i> | | |
| EntL8a | 4,98 | 29,4 |
| EntL8b | 5,12 | 28,5 |
| SalL8c | 5,47 | 29,25 |
| SalL8d | 6,45 | 29,02 |
| Valor promedio | 5,51 | 29,04 |
| <i>Muestras sólidas</i> | | |
| EntL8a | 5,47 | 29,00 |
| EntL8b | 6,45 | 28,50 |
| SalL8c | 5,27 | 29,25 |
| SalL8d | 5,50 | 29 |
| Valor promedio | 5,67 | 28,94 |

Nota: Datos obtenidos en el laboratorio de control y calidad de la extractora de aceite de palma.

Muestras procesadas

Las muestras sólidas y líquidas de agua residual se llevaron al Laboratorio de Control y Calidad de la empresa, para su procesamiento; las muestras sólidas se inocularon en medio selectivo Xilosa, Lisina, Desoxicolato Agar (XLD Agar) por el método de estriado, teniendo en cuenta que el uso del medio permitió el aislamiento de patógenos entéricos Gram negativos. De las muestras líquidas se realizó diluciones seriadas y se inoculó en medio selectivo Agar Mac Conkey con el fin de obtener colonias puras.

En la Figura 12 se reflejan los resultados obtenidos: crecimiento de diversas colonias con diferente forma, elevación, color y margen.

Figura 12

Crecimiento de microorganismos en medio Xilosa, Lisina, Desoxicolato, a partir de muestras de agua residual industrial.



Fuente: Gabriela Muñoz

Se realizó una caracterización preliminar de su forma, tamaño, elevación, color y margen. De acuerdo con la caracterización se logró establecer diferentes colonias correspondientes a hongos, bacterias y levaduras. Una vez caracterizadas las colonias de aspecto diferente se aislaron y subcultivaron en medios sólidos, con el fin de obtener cultivos puros.

Cultivos puros obtenidos

En la Tabla 8 se registraron los aislamientos obtenidos en los medios a partir de las muestras sólidas y líquidas. Se observa que, a partir de muestras líquidas de agua residual, se obtuvieron un total de 13 aislamientos; 3 caracterizados como levaduras y 10 como bacilos Gram negativos. A partir de las muestras sólidas, se obtuvieron un total de 8 aislamientos (2, 6) caracterizados como levaduras y bacilos Gram negativos respectivamente.

Las muestras analizadas presentaron crecimiento de hongos filamentosos, sin embargo, en esta investigación no se consideran.

Tabla 8

Número de aislados de Bacterias y Levaduras, obtenidos en los medios sólidos, a partir de las muestras de la laguna facultativa L-8.

| Muestras | Potencial de Hidrógeno (pH) | Levaduras | Bacilos Gram - | Total |
|--------------------------|------------------------------------|------------------|-----------------------|--------------|
| <i>Muestras líquidas</i> | | | | |
| EntL8a-L | 4,98 | 1 aislamientos | 2 aislamientos | |
| EntL8b-L | 5,12 | 1 aislamientos | 2 aislamientos | |
| SalL8c-L | 5,47 | | 5 aislamientos | |
| SalL8d-L | 6,45 | 1 aislamientos | 2 aislamientos | |
| Total | | 3 | 10 | 13 |
| <i>Muestras sólidas</i> | | | | |
| EntL8a-S | 5,47 | | 3 aislamientos | |
| EntL8b-S | 6,45 | 1 aislamientos | 2 aislamientos | |
| SalL8c-S | 5,27 | | 1 aislamientos | |
| SalL8d-S | 5,50 | 1 aislamientos | 1 aislamientos | |
| Total | | 2 | 6 | 8 |

Nota: aislamientos obtenidos de muestras sólidas y líquidas inoculados en medios agar Mac Conkey, agar XLD y agar nutriente. *Fuente:* Gabriela Muñoz

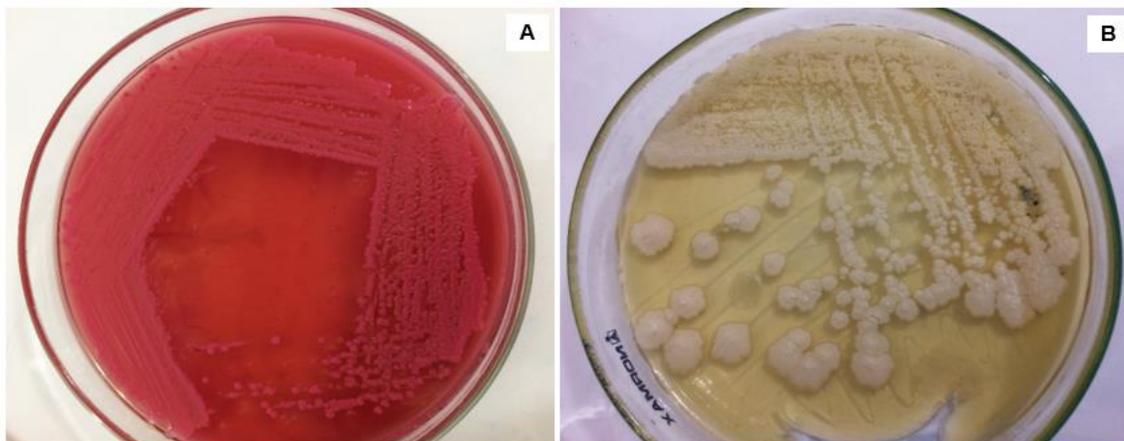
Los 21 aislamientos alcanzados a partir de muestras sólidas y líquidas del agua residual permiten mencionar que dichos microorganismos se han adaptado a las condiciones fisicoquímicas, consiguiendo crecer y desarrollar una flexibilidad metabólica. En la figura 13 se puede observar fotografías de cultivos puros obtenidos.

El etiquetado de cada muestra procesada genero un código de identificación para trabajar en el Laboratorio, nombrando el punto de muestreo (Entrada: "Ent", Salida: "Sal"), el número de la laguna ("L1, L8, L12"), la abreviatura del recipiente ("a, b, c, ..., etc."), y el tipo de muestra (Líquida: "L", Sólida: "S"), dando como resultado

ejemplificado “EntL8a-L”, que se refiere a la Entrada de la Laguna L-8, recipiente “a” y es procedente de una muestra líquida.

Figura 13

Crecimiento de cultivos puros obtenidos



Nota: A: cepa bacteriana (E. coli) aislada en medio Agar MacConkey. B: levadura aislada en medio Agar Nutriente.

Identificación y Caracterización Bioquímica

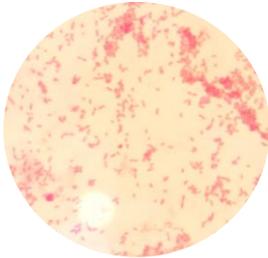
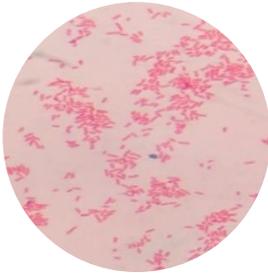
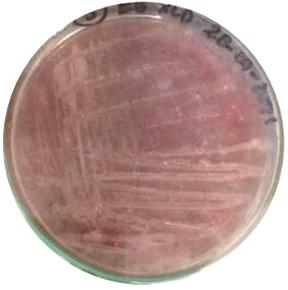
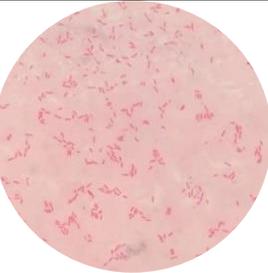
Caracterización macroscópica y microscópica

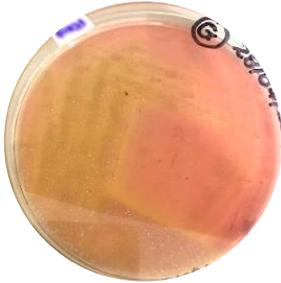
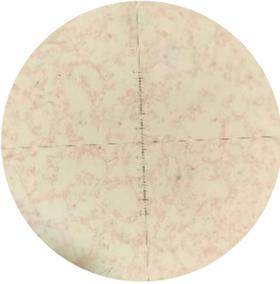
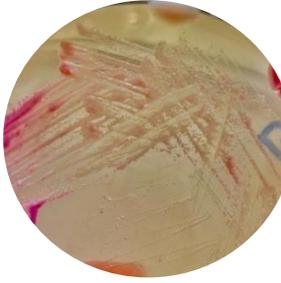
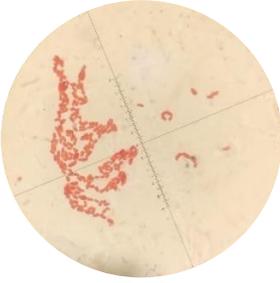
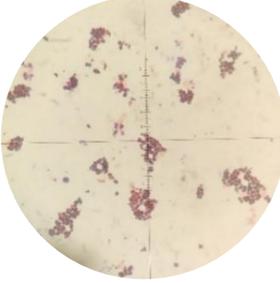
En la caracterización macroscópica se fijó la morfología de las cepas bacterianas obtenidas, reconociendo la forma (circular, filamentosa, irregular, puntiforme, rizoide), color, borde (liso o irregular), y la elevación (plana, convexa, pulvinada).

Mediante tinción Gram, se determinó 16 cepas bacterianas que tenía la morfología de bacilos Gram negativos, En la Tabla 9, se muestran las características microscópicas y macroscópicas de los 16 aislamientos caracterizados como bacterias Gram negativas y un aislamiento caracterizado como levadura.

Tabla 9

Caracterización microscópica y macroscópica de los aislamientos obtenidos en los medios sólidos, a partir de las muestras tomadas de la laguna facultativa L8.

| Aislamiento | Características Microscópicas | Características Macroscópicas | Morfología | |
|--|-------------------------------|--|--|--|
| | | | Vista macroscópica | Vista microscópica |
| C1-SalL8c-L L S9A-SalL8c-L 79-SalL8c-S | Bacilos (Gram negativos) | Colonias pequeñas de forma circular, color rosado, borde entero, y elevación plana |  |  Lente objetivo: 100x |
| 5L-EntL8a-L L8R-EntL8a-S S9T-SalL8d-S C2-EntL8a-L | Bacilos (Gram negativos) | Colonias pequeñas de forma circular, color lila, borde entero, y elevación convexa. |  |  Lente objetivo: 100x |
| L-EntL8b-L | Bacilos (Gram negativos) | Colonias pequeñas de forma circular, de color lila, borde entero, y elevación plana. |  |  Lente objetivo: 100x |

| Aislamiento | Características Microscópicas | Características Macroscópicas | Morfología | |
|--|-------------------------------|---|--|--|
| CM-SalL8c-L G2-EntL8b-L 9MS-SalL8d-L RL8-SalL8d-L | Bacilos (Gram negativos) | Colonias pequeñas de forma circular, de color amarilla, borde entero, y elevación plana. |  |  Lente objetivo: 100x |
| L8A-EntL8b-S SL9A-SalL8c-L | Bacilos (Gram negativos) | Colonias pequeñas de forma circular, de color blanco, borde entero, y elevación plana. |  |  Lente objetivo: 100x |
| Lrugosa-SalL8c-L | Bacilo (Gram negativos) | Colonias pequeñas de forma circular, de color rosado, borde liso, y elevación convexa. |  |  Lente objetivo: 100x |
| Levadura-(4Bact)-EntL8b-S | cocos (Gram positivos) | Colonias medianas de forma circular, de color blanco, borde irregular, y elevación convexa. |  |  Lente objetivo: 100x |

Nota: las fotos en el microscopio fueron tomadas con aumento 100 x. *Fuente:* Gabriela Muñoz

Se logró 16 aislamientos, dividiéndose en 9 aislamientos con elevación plana, forma circular, borde entero, en cuanto al color: tres de color rosado, una lila; tres amarillas y dos blancas, todas de tamaño pequeño, mientras que, de los 7 aislamientos con elevación convexa, mostraron forma circular, cinco con borde liso y una con borde irregular; cuatro de color lila, una rosada y una blanca.

Caracterización bioquímica

Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Pruebas bioquímicas de bacterias Gram negativas y levadura, aislados de la Laguna facultativa perteneciente al Tratamiento de efluentes.

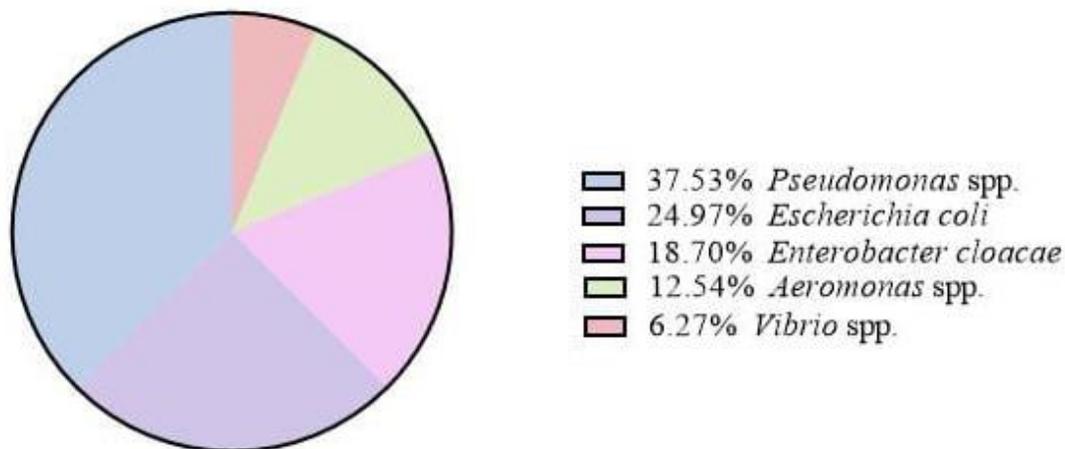
| FECHA | CEPAS | CATALASA | PRUEBAS DE BATERIA CORTA | | | | | | IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA |
|------------|-------|----------|--------------------------|-----|-----|---------|------|-------|-------------------------------|
| | | | GAS | HS2 | TSI | CITRATO | UREA | INDOL | |
| 19/09/2021 | 1 | + | - | - | K/K | + | - | - | <i>Pseudomonas</i> spp. |
| 19/09/2021 | 2 | + | - | - | K/K | + | - | - | <i>Pseudomonas</i> spp. |
| 19/09/2021 | 3 | + | + | - | K/A | + | - | + | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| 19/09/2021 | 4 | + | - | - | K/K | + | + | - | <i>Pseudomonas</i> spp. |
| 19/09/2021 | 5 | + | - | - | K/K | + | - | - | <i>Pseudomonas</i> spp. |
| 23/09/2021 | 7 | - | + | - | A/A | - | - | + | <i>Escherichia coli</i> |
| 26/09/2021 | 8 | + | + | + | A/A | - | - | - | <i>Aeromonas</i> spp. |
| 23/09/2021 | 9 | + | - | - | K/K | + | - | - | <i>Pseudomonas</i> spp. |
| 23/09/2021 | 10 | + | - | - | A/A | - | - | + | <i>Vibrio</i> spp. |
| 23/09/2021 | 11 | - | + | - | A/A | - | - | + | <i>Escherichia coli</i> |
| 26/09/2021 | 12 | - | + | - | A/A | - | - | + | <i>Escherichia coli</i> |
| 26/09/2021 | 13 | + | + | + | A/A | - | - | - | <i>Aeromonas</i> spp. |
| 26/09/2021 | 14 | - | + | - | A/A | - | - | + | <i>Escherichia coli</i> |
| 26/09/2021 | 15 | + | - | - | K/K | + | - | - | <i>Pseudomonas</i> spp. |
| 26/09/2021 | 16 | + | + | - | K/A | + | - | + | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| 26/09/2021 | 18 | + | + | - | K/A | + | - | + | <i>Enterobacter cloacae</i> |

Nota: Agar hierro triple azúcar (TSI); sulfuro, indol, motilidad (SIM); +/- positivo/negativo.

En la figura 14, se observa el porcentaje de bacterias Gram negativas aisladas de la laguna facultativa N8, durante el mes de octubre 2021.

Figura 14

Porcentaje de Bacterias Gram negativas aisladas de la Laguna Facultativa N8, perteneciente al POME



Nota. Imagen elaborada en *GraphPad Software*.

Se aisló *Pseudomonas* spp. en un porcentaje de 37.53%; *Escherichia coli* en un porcentaje de 24.97%; *Enterobacter cloacae* 18.70%; *Aeromonas* spp. 12.54%; *Vibrio* spp. 6.27%; de la laguna facultativa L-8.

Evaluación *in vitro* de la capacidad de remoción orgánica

Evaluación de la cinética de crecimiento

Para evaluar el crecimiento de las bacterias Gram negativas aisladas, se realizó mediciones de absorbancia a través del tiempo, de los cuales la tabla 11, muestra las figuras de cada una de las cepas aisladas.

Tabla 11

Evaluación de las curvas de crecimiento de las cinco bacterias aisladas en el medio líquido denominado caldo nutriente comercial.

Curvas de crecimiento de las cepas *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp.

Figura 15

Curva de crecimiento de Escherichia coli.

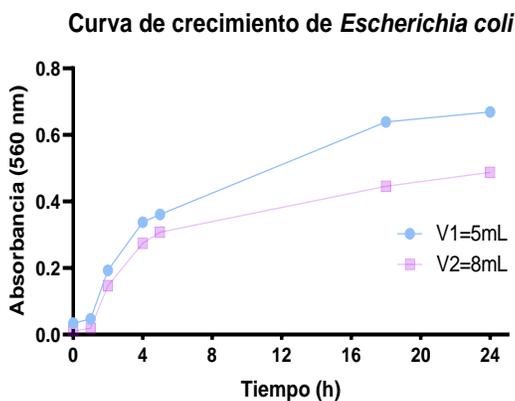


Figura 16

Curva de crecimiento de Enterobacter cloacae.

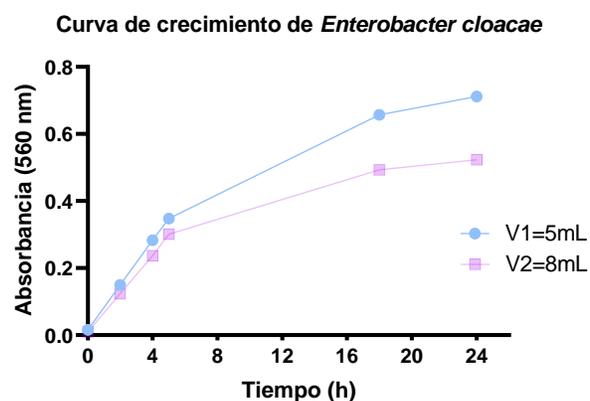


Figura 17

Curva de crecimiento de Pseudomonas spp.

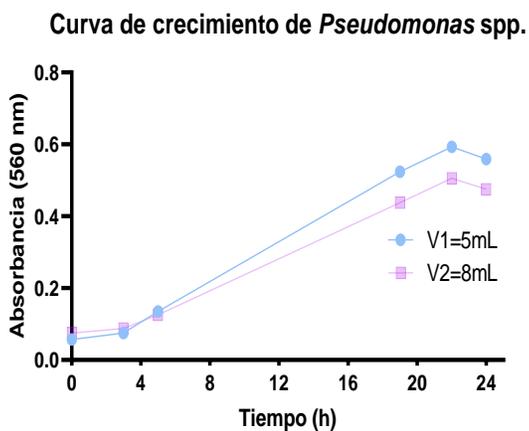


Figura 18

Curva de crecimiento de Vibrio spp.

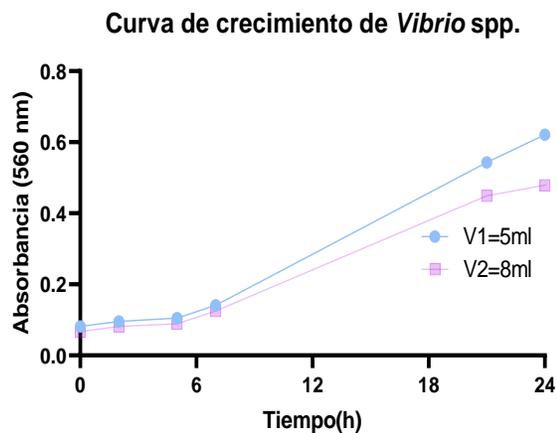
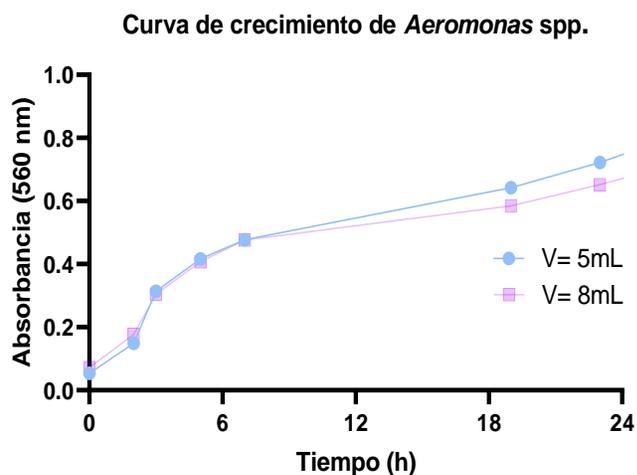


Figura 19

Curva de crecimiento de *Aeromonas* spp.



Nota: Curvas de crecimiento a 37°C en caldo nutriente (Nutrient Broth). Inóculo: 2 UFC; curvas de crecimiento elaboradas en *GraphPad Software*.

Preparación de inóculo bacteriano

La Figura 20 muestra el proceso de medición de los tubos de ensayo ajustando el estándar de McFarland.

Figura 20

Medición de la densidad celular en el equipo DR 900



Nota; **A:** Tubos de ensayo con 8 mL de inóculo bacteriano; **B:** Equipo DR 900.

Para la establecer la concentración de las cepas bacterianas, se ocupó volúmenes de 5 y 8 mL de agua destilada estéril, para ello se inoculó en Agar

MacConkey y se dejó incubar a 30 °C durante 24 horas. Con un palillo estéril se raspó la biomasa de la superficie del medio para colocar en los tubos de ensayo y ajustar a un estándar de McFarland de 1.20, medida por absorbancia con una longitud de onda de 540 nm.

Pre -ensayo

El Pre-ensayo se realizó con la bacteria *Escherichia coli*, con código de identificación C2 (cepa N2), tomada al azar. La tabla 12, registra los resultados del pre-ensayo evaluado en cuatro tiempos (0, 24, 48 y 72) horas con diferentes volúmenes de suspensión bacteriana.

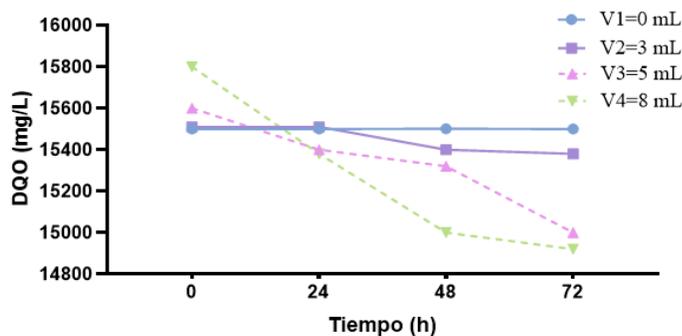
Tabla 12

Resultados promedio del análisis de DQO con diferentes volúmenes de la bacteria Escherichia coli.

| Bacteria | Dosis (mL) | Tiempo (h) | | | |
|---------------------------------------|------------|------------|-------|-------|-------|
| | | 0 | 24 | 48 | 72 |
| <i>Escherichia coli</i> Código: C2 | 0 mL | 15000 | 15500 | 15501 | 15500 |
| | 3 mL | 15010 | 15510 | 15400 | 15380 |
| | 5 mL | 15100 | 15500 | 15320 | 15000 |
| | 8 mL | 15300 | 15600 | 15280 | 14920 |

Figura 21

Comportamiento de la DQO, antes y después de la aplicación de diferentes volúmenes (0,3, 5, 8) mL de la bacteria Escherichia coli.

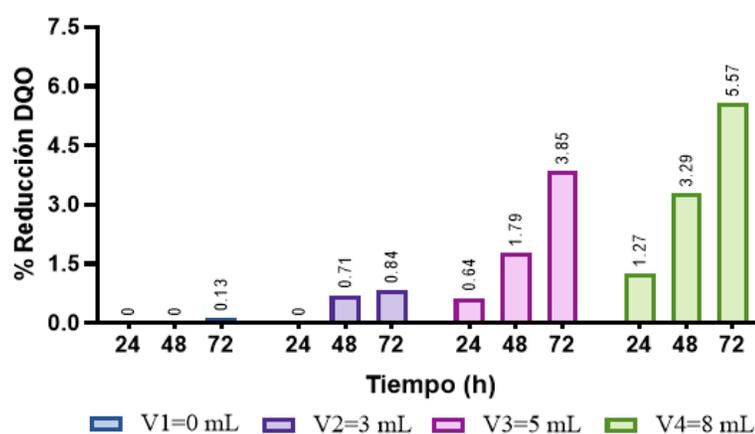


Nota: Imagen creada en GraphPad Software.

En la figura 21, se observa que el volumen de 3 mL de *Escherichia coli* aplicado al efluente, no presenta diferencia significativa a comparación de los volúmenes de 5 y 8 mL de *Escherichia coli*, que presentaron una reducción de DQO de 15100 mg/L a 15000 mg/L; y 15300 mg/L a 14920 mg/L respectivamente.

Figura 22

Porcentaje de reducción del DQO, después de la aplicación de diferentes volúmenes (3, 5, 8) mL de *Escherichia coli*, evaluado en cuatro tiempos (0, 24, 48, 72) h.



Nota: Imagen elaborada en GraphPad Software.

De acuerdo con los resultados establecidos en el pre-ensayo, se seleccionó dos dosis (5, 8)mL para posteriormente trabajar con cada cepa bacteriana aislada.

Evaluación de la capacidad de remoción orgánica

Se evaluó el efecto del tiempo y dosis de suspensión bacteriana preparada en las muestras tomadas al ingreso del tratamiento de efluentes industriales (efluente crudo), las suspensiones bacterias se realizaron seleccionando cinco bacterias preliminarmente aisladas y reportadas en la tabla 10, las dosis de cada ensayo fueron de (5, 8)mL, el ensayo se realizó por duplicado.

Diseño experimental

El diseño empleado fue un diseño completamente al azar (DCA), se detalla en la tabla 13.

Tabla 13

Diseño experimental completamente al azar

| Cepa | Volumen (mL) | Tiempo (h) | % DQO |
|-------------|---------------------|-------------------|---------------|
| Control | 5 | 0 (0 h) | % $R - DQO_1$ |
| Cepa 1 | 8 | 24 (1 día) | % $R - DQO_2$ |
| Cepa 2 | | 48 (2 días) | |
| ... | | 120 (5 días) | ... |
| Cepa n | | 432 (18 días) | % $R - DQO_n$ |

Nota: % $R - DQO_{1,...,n}$: Porcentaje de reducción del DQO.

El diseño experimental fue con (6) cepas x (2) volúmenes x (5) tiempos = 60 datos, donde el ensayo se realizó con un control y cinco bacterias correspondientes a *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas* spp., y *Vibrio* spp., dos volúmenes de (5, 8) mL, y cinco tiempos (0, 24, 48, 120, 432) h.

Numeración de cepas bacterianas

Con el fin de evitar confusiones en cada ensayo, se estableció una numeración para cada bacteria aislada e identificada, en la tabla 14 se detalla la información.

Tabla 14

Numeración de cepas bacterianas aisladas e identificadas

| Bacteria | Numeración |
|-----------------------------|-------------------|
| <i>Pseudomonas</i> spp. | Cepa 1 |
| <i>Escherichia coli</i> | Cepa 2 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Cepa 3 |
| <i>Aeromonas</i> spp. | Cepa 4 |
| <i>Vibrio</i> spp. | Cepa 5 |

Parámetros ambientales (T y pH)

En la Tabla 15 se observa los datos promedio de temperatura y potencial de hidrógeno generados del seguimiento de los ensayos, evaluados en cinco tiempos (0, 24, 48, 120, 432) h.

Tabla 15

Resultados de temperatura y potencial de hidrógeno determinados durante el ensayo de remoción orgánica.

| Cepa N° | Dosis (mL) | Parámetro | Tiempo (h) | | | | |
|---------|------------|-----------|------------|-------|-------|-------|-------|
| | | | 0 | 24 | 48 | 120 | 432 |
| Control | 5 | T [°C] | 28,83 | 26,53 | 26,76 | 25,84 | 26,99 |
| | | pH | 4,84 | 4,8 | 4,9 | 4,98 | 4,88 |
| | 8 | T [°C] | 26,69 | 26,92 | 26,42 | 25,51 | 26,38 |
| | | pH | 4,25 | 4,3 | 4,54 | 4,78 | 4,79 |
| Cepa 1 | 5 | T [°C] | 27,65 | 26,1 | 26,85 | 26 | 26,01 |
| | | pH | 4,69 | 4,93 | 5,04 | 5,09 | 5,1 |
| | 8 | T [°C] | 27,3 | 26,1 | 26 | 26 | 26,01 |
| | | pH | 4,8 | 4,88 | 5,01 | 5,03 | 5,04 |
| Cepa 2 | 5 | T [°C] | 26,5 | 26 | 26,4 | 26 | 26,01 |
| | | pH | 4,1 | 4,26 | 4,55 | 4,95 | 4,96 |
| | 8 | T [°C] | 26,65 | 26,1 | 26 | 26 | 26,01 |
| | | pH | 4,5 | 4,44 | 4,86 | 5,01 | 5,02 |
| Cepa 3 | 5 | T [°C] | 27,65 | 26,1 | 26,4 | 26 | 26,01 |
| | | pH | 4,34 | 4,3 | 4,55 | 4,95 | 4,96 |
| | 8 | T [°C] | 27,45 | 26,1 | 26 | 26 | 26,01 |
| | | pH | 4,5 | 4,69 | 4,86 | 5,01 | 5,02 |
| Cepa 4 | 5 | T [°C] | 27,75 | 25,6 | 26,2 | 26,1 | 26,11 |
| | | pH | 4,67 | 4,63 | 4,82 | 4,9 | 4,91 |
| | 8 | T [°C] | 27,5 | 25,45 | 27,4 | 26,2 | 26,21 |
| | | pH | 4,95 | 5,02 | 5,04 | 5,13 | 5,14 |
| Cepa 5 | 5 | T [°C] | 31,98 | 28,23 | 26,85 | 25,9 | 25,91 |
| | | pH | 4,51 | 4,45 | 4,56 | 4,82 | 4,83 |
| | 8 | T [°C] | 31,75 | 28,28 | 27,1 | 25,5 | 25,51 |
| | | pH | 4,46 | 4,44 | 4,66 | 4,78 | 4,79 |

Nota: Resultados obtenidos en el laboratorio de control y calidad de la empresa extractora de aceite de palma.

Análisis de la Demanda Química de Oxígeno

La tabla 16, detalla los resultados del análisis de DQO a las muestras que contenían la bacteria en estudio en cinco tiempos: 0, 1, 2, 5 y 18 días, que tiene como propósito, evaluar la disminución de carga orgánica en el efluente.

Tabla 16

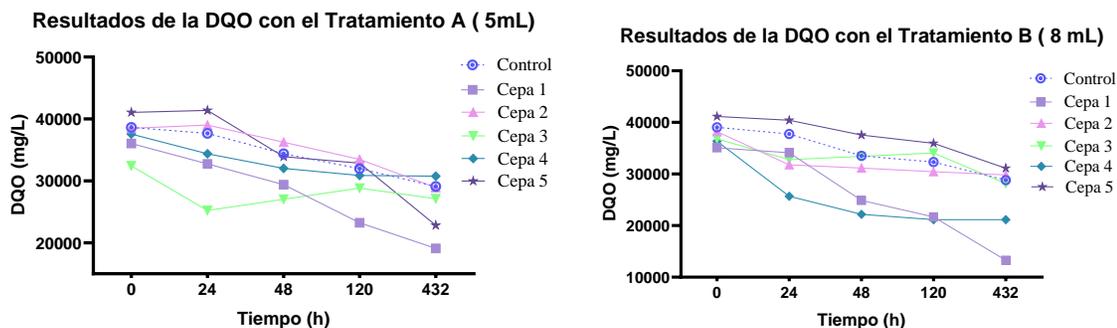
Resultados promedio del análisis de la DQO en muestras de efluente industrial, después de la aplicación de los inóculos bacterianos tomados en diferentes tiempos.

| Volumen (V= 5 mL) | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|---------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
| Tiempo | Control | | Cepa 1 | | Cepa 2 | | Cepa 3 | | Cepa 4 | | Cepa 5 | |
| DQO (mg/L) | | | | | | | | | | | | |
| | E1 | E2 | E1 | E2 | E1 | E2 | E1 | E2 | E1 | E2 | E1 | E2 |
| 0 h | 38253 | 39028 | 35920 | 36040 | 38921 | 36160 | 32392 | 32440 | 37763 | 37347 | 41092 | 41028 |
| 24 h | 38392 | 36981 | 33000 | 32750 | 38186 | 32500 | 25182 | 25240 | 34252 | 34524 | 41795 | 40981 |
| 48 h | 33662 | 35110 | 29600 | 29400 | 36144 | 29200 | 27029 | 27060 | 31475 | 32592 | 32815 | 34989 |
| 120 h | 31552 | 32443 | 22592 | 23240 | 32983 | 23888 | 28799 | 28880 | 30271 | 31473 | 31268 | 34443 |
| 432 h | 29697 | 28535 | 19380 | 19090 | 28873 | 18800 | 27093 | 27160 | 31004 | 30500 | 23020 | 22635 |
| Volumen (V= 8g mL) | | | | | | | | | | | | |
| 0 h | 38771 | 39347 | 35100 | 35080 | 38180 | 38240 | 36791 | 36840 | 35534 | 37160 | 40270 | 42050 |
| 24 h | 38001 | 37500 | 34203 | 34060 | 31757 | 31840 | 32750 | 32800 | 25880 | 25520 | 40025 | 40800 |
| 48 h | 34449 | 32608 | 23460 | 26339 | 31109 | 31160 | 33403 | 33460 | 21855 | 22480 | 37011 | 38060 |
| 120 h | 32452 | 32153 | 22020 | 21339 | 30390 | 30480 | 34075 | 34120 | 20765 | 21540 | 35748 | 36140 |
| 432 h | 29463 | 28143 | 13080 | 13500 | 29779 | 29840 | 28129 | 28200 | 20765 | 21520 | 31613 | 30650 |

Nota: E1: Ensayo 1; E2: Ensayo 2. Resultados obtenidos en el Laboratorio de Control y Calidad de la extractora de aceite de palma.

Figura 23

Variación del valor de la DQO, transcurridas las 432 h (18 días) en cada una de las cepas.



Se evidencia que en la figura 23, en el tratamiento A (volumen de 5 mL), mostro que la reducción del DQO fue mayor en las cepas 1 y 5, mientras que en el tratamiento B (volumen de 8 mL), fue mayor la reducción del DQO, con las cepas 1 y 4, habiendo transcurrido 432h.

Porcentaje de remoción orgánica

Se calcularon los porcentajes de remoción orgánica mediante la ecuación 6, en base al análisis de DQO evaluado con las seis cepas bacterianas, se muestra en la tabla 17.

Tabla 17

Resultados del porcentaje de reducción de la DQO

| | | Volumen (V= 5 mL) | | | | | | | | | | | |
|--------|---------|-------------------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|------|------|
| Tiempo | Control | Cepa 1 | | Cepa 2 | | Cepa 3 | | Cepa 4 | | Cepa 5 | | | |
| | | E1 | E2 | E1 | E2 | E1 | E2 | E1 | E2 | E1 | E2 | | |
| 0 h | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 24 h | | -0,4 | 5,2 | 8,1 | 9,1 | 1,9 | 10,1 | 22,3 | 22,2 | 9,3 | 7,6 | -1,7 | 0,1 |
| 48 h | | 12 | 10 | 17,6 | 18,4 | 7,1 | 19,2 | 16,6 | 16,6 | 16,7 | 12,7 | 20,1 | 14,7 |
| 120 h | | 17,5 | 16,9 | 37,1 | 35,5 | 15,3 | 33,9 | 11,1 | 11 | 19,8 | 15,7 | 23,9 | 16,1 |
| 432 h | | 22,4 | 26,9 | 46 | 47 | 25,8 | 48 | 16,4 | 16,3 | 17,9 | 18,3 | 44 | 44,8 |

| | | Volumen (V= 8 mL) | | | | | | | | | | | |
|--------------|--|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 0 h | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 h | | 2 | 4,7 | 2,6 | 2,9 | 16,8 | 16,7 | 11 | 11 | 27,2 | 31,3 | 0,6 | 3 |
| 48 h | | 11,1 | 17,1 | 33,2 | 24,9 | 18,5 | 18,5 | 9,2 | 9,2 | 38,5 | 39,5 | 8,1 | 9,5 |
| 120 h | | 16,3 | 18,3 | 37,3 | 39,2 | 20,4 | 20,3 | 7,4 | 7,4 | 41,6 | 42 | 11,2 | 14,1 |
| 432 h | | 24 | 28,5 | 62,7 | 61,5 | 22 | 22 | 23,5 | 23,5 | 41,6 | 42,1 | 21,5 | 27,1 |

Figura 24

Porcentaje de remoción de la DQO, posterior a la aplicación de cepas con el tratamiento A (volumen de 5 mL) evaluado en cuatro tiempos.

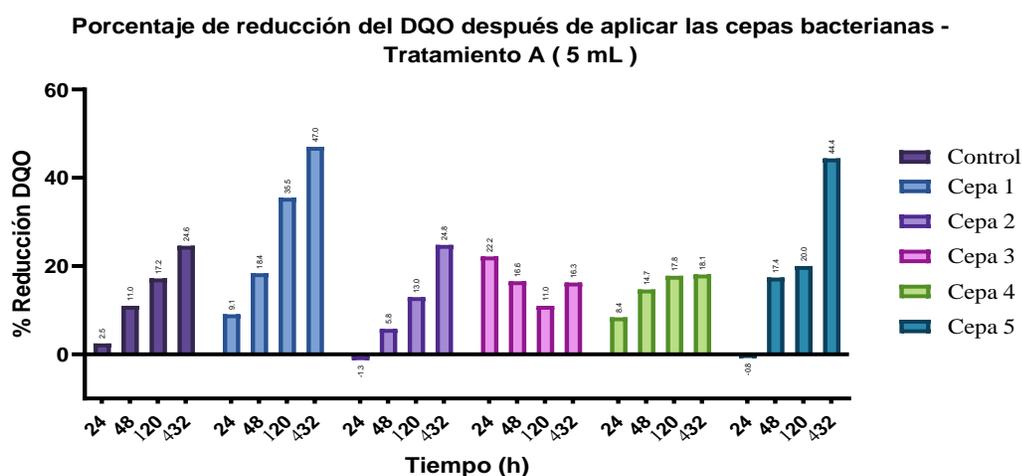
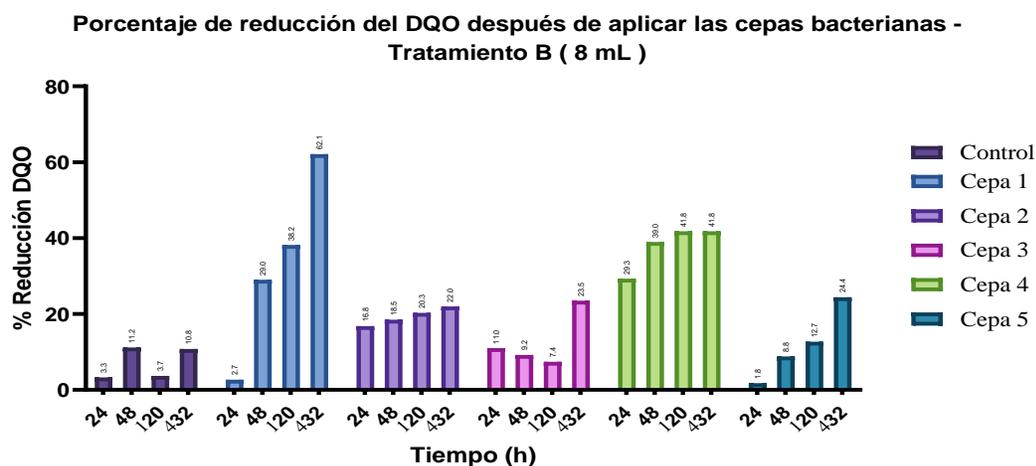


Figura 25

Porcentaje de remoción de la DQO, posterior a la aplicación de cepas con el tratamiento B (volumen de 8 mL) evaluado en cuatro tiempos.



Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA), para comparar las varianzas entre las medias de diferentes grupos.

Se establece las siguientes pruebas de hipótesis:

H_0 : Las medias de las seis cepas son iguales.

H_1 : Las medias de las seis cepas no son iguales.

H_0 : Las medias de los dos volúmenes son iguales.

H_2 : Las medias de los dos volúmenes no son iguales.

H_0 : Las medias de los cinco tiempos son iguales.

H_3 : Las medias de los cinco tiempos no son iguales.

El análisis estadístico ANOVA que se muestra en la Figura 26, se ejecutó con un nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0,05$).

Figura 26

Análisis estadístico multivariable (ANOVA)

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| %DQO | 120 | 0,99 | 0,98 | 12,93 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------------------|----------|-----|---------|--------|---------|
| Modelo | 24687,18 | 59 | 418,43 | 102,97 | <0,0001 |
| Cepa | 3113,26 | 5 | 622,65 | 153,23 | <0,0001 |
| Volumen | 385,21 | 1 | 385,21 | 94,80 | <0,0001 |
| Tiempo | 13612,71 | 4 | 3403,18 | 837,50 | <0,0001 |
| Cepa*Volumen | 1964,51 | 5 | 392,90 | 96,69 | <0,0001 |
| Cepa*Tiempo | 4057,65 | 20 | 202,88 | 49,93 | <0,0001 |
| Volumen*Tiempo | 110,34 | 4 | 27,58 | 6,79 | 0,0001 |
| Cepa*Volumen*Tiempo | 1443,50 | 20 | 72,18 | 17,76 | <0,0001 |
| Error | 243,81 | 60 | 4,06 | | |
| Total | 24930,99 | 119 | | | |

Los resultados del ANOVA muestran que en la variable “modelo”, el p valor es menor α ($0,001 < 0,05$) donde el modelo $\% RDQO_{1,\dots,n} = f(\text{cepa}, \text{volumen}, \text{tiempo})$ se establece como un buen modelo de tratamiento de datos. Además, todos los valores de p -valor son menores a 0,05 por lo tanto se rechazan las hipótesis nulas (H_0) y se concluye que no existe una igualdad de medias entre los grupos, ya que al menos una de las seis cepas evaluadas produce diferencia significativa en su variable respuesta ($\% RDQO_{1,\dots,n}$), en la variable volumen al menos uno de los dos es el mejor, y en la variable tiempo al menos uno de los cinco es el mejor.

A través de la prueba del rango múltiple (prueba de Duncan), se demostró que las diferencias entre las medias de la variable “cepa” son diferentes, donde la figura 27, muestra que la cepa (C) produce una mayor reducción del DQO respecto a las demás cepas.

Figura 27

Prueba Duncan respecto a las cepas

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 4,0635 gl: 60

| Cepa | Medias | n | E.E. | |
|---------|--------|----|------|---|
| Control | 11,63 | 20 | 0,45 | A |
| Cepa 3 | 11,74 | 20 | 0,45 | A |
| Cepa 2 | 11,99 | 20 | 0,45 | A |
| Cepa 5 | 12,86 | 20 | 0,45 | A |
| Cepa 4 | 21,09 | 20 | 0,45 | B |
| Cepa 1 | 24,22 | 20 | 0,45 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En cuanto a la variable “volumen”, la figura 28 muestra que el mejor volumen aplicado fue de 8 mL (B) debido a que presenta diferencia de medias estadísticamente significativo, donde el volumen mayor originó un incremento en la reducción del DQO. Así mismo en la variable “tiempo”, a las 432 h (18 días) donde presenta un mejor porcentaje de reducción del DQO.

Figura 28

Prueba Duncan respecto al volumen y el tiempo

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 4,0635 gl: 60

| Volumen | Medias | n | E.E. | |
|---------|--------|----|------|---|
| 5 | 13,79 | 60 | 0,26 | A |
| 8 | 17,38 | 60 | 0,26 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 4,0635 gl: 60

| Tiempo | Medias | n | E.E. | |
|--------|--------|----|------|---|
| 0 | 0,00 | 24 | 0,41 | A |
| 24 | 8,75 | 24 | 0,41 | B |
| 48 | 16,88 | 24 | 0,41 | C |
| 120 | 21,02 | 24 | 0,41 | D |
| 432 | 31,28 | 24 | 0,41 | E |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Una vez obtenidos los resultados del ANOVA (figura 25) se efectuaron pruebas de interacción para las variables independientes (cepa, volumen, tiempo) y dependiente (%DQO) con el objetivo de determinar si existen efectos significativos de las variables independientes sobre la variable dependiente. La figura 29, muestra que la mejor interacción fue la combinación de la cepa 1 con un volumen de 8 mL, y con un tiempo de 432 h denominada con la letra "X", misma que se establece como estadísticamente significativa.

Figura 29

Pruebas de interacción para las variables independientes (cepa, volumen, tiempo) y dependiente (%DQO).

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 4,0635 gl: 60

| Cepa | Volumen | Tiempo | Medias | n | E.E. | |
|---------|---------|--------|--------|---|------|-----------|
| Cepa 2 | 5 | 24 | -1,35 | 2 | 1,43 | A |
| Cepa 5 | 5 | 24 | -0,80 | 2 | 1,43 | A |
| Control | 5 | 0 | 0,00 | 2 | 1,43 | A |
| Control | 8 | 0 | 0,00 | 2 | 1,43 | A |
| Cepa 5 | 8 | 0 | 0,00 | 2 | 1,43 | A |
| Cepa 5 | 5 | 0 | 0,00 | 2 | 1,43 | A |
| Cepa 4 | 5 | 0 | 0,00 | 2 | 1,43 | A |
| Cepa 1 | 5 | 0 | 0,00 | 2 | 1,43 | A |
| Cepa 2 | 5 | 0 | 0,00 | 2 | 1,43 | A |
| Cepa 1 | 8 | 0 | 0,00 | 2 | 1,43 | A |
| Cepa 4 | 8 | 0 | 0,00 | 2 | 1,43 | A |
| Cepa 3 | 5 | 0 | 0,00 | 2 | 1,43 | A |
| Cepa 3 | 8 | 0 | 0,00 | 2 | 1,43 | A |
| Cepa 2 | 8 | 0 | 0,00 | 2 | 1,43 | A |
| Cepa 5 | 8 | 24 | 1,80 | 2 | 1,43 | A B |
| Control | 5 | 24 | 2,40 | 2 | 1,43 | A B |
| Cepa 1 | 8 | 24 | 2,75 | 2 | 1,43 | A B |
| Control | 8 | 24 | 3,35 | 2 | 1,43 | A B C |
| Cepa 2 | 5 | 48 | 5,80 | 2 | 1,43 | B C D |
| Cepa 3 | 8 | 120 | 7,40 | 2 | 1,43 | C D E |
| Cepa 4 | 5 | 24 | 8,45 | 2 | 1,43 | D E F |
| Cepa 5 | 8 | 48 | 8,80 | 2 | 1,43 | D E F F |
| Cepa 1 | 5 | 24 | 9,10 | 2 | 1,43 | D E F F |
| Cepa 3 | 8 | 48 | 9,20 | 2 | 1,43 | D E F F |
| Cepa 3 | 8 | 24 | 11,00 | 2 | 1,43 | E F F G |
| Control | 5 | 48 | 11,00 | 2 | 1,43 | E F F G |
| Cepa 3 | 5 | 120 | 11,05 | 2 | 1,43 | E F F G |
| Cepa 5 | 8 | 120 | 12,65 | 2 | 1,43 | F G H |
| Cepa 2 | 5 | 120 | 13,00 | 2 | 1,43 | F G H I |
| Control | 8 | 48 | 14,10 | 2 | 1,43 | G H I J |
| Cepa 4 | 5 | 48 | 14,70 | 2 | 1,43 | G H I J |
| Cepa 4 | 5 | 48 | 14,70 | 2 | 1,43 | G H I J |
| Cepa 3 | 5 | 432 | 16,35 | 2 | 1,43 | H I J K |
| Cepa 3 | 5 | 48 | 16,60 | 2 | 1,43 | H I J K |
| Cepa 2 | 8 | 24 | 16,75 | 2 | 1,43 | H I J K |
| Control | 5 | 120 | 17,20 | 2 | 1,43 | H I J K |
| Control | 8 | 120 | 17,30 | 2 | 1,43 | H I J K L |
| Cepa 5 | 5 | 48 | 17,40 | 2 | 1,43 | H I J K L |
| Cepa 4 | 5 | 120 | 17,75 | 2 | 1,43 | I J K L M |
| Cepa 4 | 5 | 432 | 18,10 | 2 | 1,43 | J K L M |
| Cepa 1 | 5 | 48 | 18,40 | 2 | 1,43 | J K L M |
| Cepa 2 | 8 | 48 | 18,50 | 2 | 1,43 | J K L M |
| Cepa 5 | 5 | 120 | 20,00 | 2 | 1,43 | K L M N |
| Cepa 2 | 8 | 120 | 20,35 | 2 | 1,43 | K L M N O |
| Cepa 2 | 8 | 432 | 22,00 | 2 | 1,43 | L M N O P |
| Cepa 3 | 5 | 24 | 22,25 | 2 | 1,43 | M N O P |
| Cepa 3 | 8 | 432 | 23,50 | 2 | 1,43 | N O P |
| Cepa 5 | 8 | 432 | 24,30 | 2 | 1,43 | N O P |
| Control | 5 | 432 | 24,65 | 2 | 1,43 | O P |
| Cepa 2 | 5 | 432 | 24,85 | 2 | 1,43 | O P Q |
| Control | 8 | 432 | 26,25 | 2 | 1,43 | P Q R |
| Cepa 1 | 8 | 48 | 29,05 | 2 | 1,43 | Q R |
| Cepa 4 | 8 | 24 | 29,25 | 2 | 1,43 | Q R |
| Cepa 1 | 5 | 120 | 35,50 | 2 | 1,43 | S |
| Cepa 1 | 8 | 120 | 38,25 | 2 | 1,43 | S T |
| Cepa 4 | 8 | 48 | 39,00 | 2 | 1,43 | S T |
| Cepa 4 | 8 | 120 | 41,80 | 2 | 1,43 | T U |
| Cepa 4 | 8 | 432 | 41,85 | 2 | 1,43 | T U |
| Cepa 5 | 5 | 432 | 44,40 | 2 | 1,43 | U W |
| Cepa 1 | 5 | 432 | 47,00 | 2 | 1,43 | U W |
| Cepa 1 | 8 | 432 | 62,10 | 2 | 1,43 | X |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Del modelo experimental planteado, se analizaron dos hipótesis, una hipótesis nula y una alternativa que según el p-valor o significancia fueron aceptadas o rechazadas de acuerdo con lo observado en los resultados obtenidos.

- H_0 : Las bacterias Gram negativas autóctonas aisladas y aplicadas *in vitro*, no remueven eficientemente la carga orgánica presente en el efluente proveniente de la planta procesadora de aceite de palma.
- H_1 : Las bacterias Gram negativas autóctonas aisladas y aplicadas *in vitro*, remueven eficientemente la carga orgánica presente en el efluente proveniente de la planta procesadora de aceite de palma.

Tras los análisis estadísticos del ANOVA arrojo que el p valor es menor α ($0,001 < 0,05$), por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H_0 : Las bacterias Gram negativas autóctonas aisladas y aplicadas *in vitro*, no remueven eficientemente la carga orgánica presente en el efluente proveniente de la planta procesadora de aceite de palma.) y se acepta la hipótesis alternativa (Las bacterias Gram negativas autóctonas aisladas y aplicadas *in vitro*, remueven eficientemente la carga orgánica presente en el efluente proveniente de la planta procesadora de aceite de palma), obteniéndose como mejor combinación; la cepa 1 con un volumen de 8 mL, y con un tiempo de 432 h, que se establece como estadísticamente significativa en comparación con las demás medias de las interacciones.

Capítulo V: Discusión

Las industrias dedicadas al procesamiento de aceite de palma generan un POME de dos principales operaciones como son la esterilización, y clarificación. El POME es un líquido de color marrón con un alto contenido de sólidos, DQO, aceites y grasas. Aun cuando el POME no es un residuo tóxico, el vertido directo a cuerpos de agua dulce podría afectar negativamente a la vida acuática, debido a que la alta temperatura y alto contenido de DQO reduce el contenido de oxígeno disuelto (Izzah et al., 2017).

Por ello, el POME ingresa a un tratamiento biológico de acidificación, digestión anaeróbica, facultativa y aeróbica, para convertir las proteínas, grasas, carbohidratos y minerales en componentes menos complejos y útiles. Las características fisicoquímicas del POME, podría variar levemente de acuerdo a la calidad de la fruta fresca, tiempo de extracción o procesos de producción (Kamyab et al., 2018). Por lo tanto, los análisis fisicoquímicos se ejecutaron tres veces por cada mes (cinco meses), con el fin de obtener un resultado promedio de la caracterización fisicoquímica del POME.

Se tomó en consideración la NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTE: RECURSO AGUA, donde establece los límites máximos permisibles de descarga a un cuerpo de agua dulce, con la finalidad de verificar si los resultados obtenidos en los análisis fisicoquímicos del POME, cumple con la norma. A continuación, se detalla cada parámetro.

El valor del pH influye en el sistema de tratamiento de efluentes, debido a que gran parte de la actividad bacteriana es sensible al pH, mismo que se desarrolla en un pH entre 4.5 – 9. Al ingreso del sistema de tratamiento, los datos arrojaron un pH entre 3.5 - 4.5, estos resultados concuerdan con lo descrito por Saad et al., (2021); Ratnasari

et al.,(2021) y Anuar et al., (2021), quienes destacan que el POME es un líquido viscoso de color marrón con un pH ácido que oscila entre 4 a 5, que se debe a la presencia de ácidos orgánicos en forma compleja y al aumento de la carga orgánica en el efluente, así mismo, en el punto de descarga al cuerpo de agua dulce (río), se consiguió un líquido de café con un pH ligeramente alcalino entre 6.5 – 7.8 (Figura 5), que según Cheah et al.,(2018) y Nahrul et al.,(2020), el color del vertido podría deberse a la presencia de la lignina, sólidos totales, y compuestos polifenólicos, mismos que podrían derivarse de procesos de esterilización y del tratamiento anaerobio. Además, es importante resaltar que el pH de 7.2 en el vertido final cumple con la normativa de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua, con un valor establecido de pH es de 6 – 9. Teniendo en cuenta que si se presenta un pH > 9, podría afectar la negativamente la vida acuática.

La temperatura influye en los aspectos bioquímicos y físicos del sistema. La figura 6, muestra que la temperatura en el transcurso del sistema de tratamiento de efluentes industriales se ubicó entre 48°C a 74°C, parámetro que se confirmó en diferentes estudios realizados por Choong et al., (2018) y Saputera et al., (2021), que afirman que las temperaturas entre 72-100 °C son provocadas por el proceso de esterilización durante la producción de aceite de palma. Khadaroo et al., (2019) menciona que la temperatura desempeña un papel fundamental en la velocidad a la que se produce la degradación anaerobia, misma que abarca los procesos de hidrolisis y metanogénesis. La degradación anaerobia presenta dos rangos de temperatura: una condición termófila con una temperatura óptima de 55 °C y una condición mesófila que funciona a temperatura optima de 35 °C, donde los datos obtenidos nos muestran que el sistema de tratamiento se desarrolla con ambas condiciones, prevaleciendo la condición mesófila con tiempos de retención hidráulicos prolongados, lo que es una

desventaja en comparación con la condición termófila que según Appels et al., (2011) genera mayor degradabilidad de compuestos orgánicos, con una mayor velocidad de las reacciones químicas y biológicas, y mayor tasa de eliminación de microorganismos patógenos, sin embargo, la aplicación prolongada de altas temperaturas generan inestabilidad en el proceso, aumentando el amoníaco libre produciendo inhibición de los microorganismos y disminuyendo el rendimiento del proceso. La temperatura promedio de 28°C en el punto de vertimiento hacia el cuerpo de agua dulce, se encuentra dentro de la normativa ambiental que establece un rango de temperatura menores a 35 °C.

En la figura 7, se observa que de una temperatura de 72.40 °C con un OD de 0.93 mg/L, habiendo transcurriendo el tratamiento biológico da como resultado un OD de 1.84 mg/L a de 28°C; estos resultados concuerdan con un estudio desarrollado por Chan et al., (2010) donde evaluaron que el aumento de la temperatura disminuyo las concentraciones de OD de 4.5 mg/L a 28 °C hasta 2,9 mg/L a 55 °C, donde estudios similares ejecutados por Tripathi & Grant Allen, (1999) sugieren que la reducción de la solubilidad del oxígeno en el agua expuesta a un alta temperatura fue la posible causa de la disminución de la concentración de OD, condición que según EPA, (2021) indica que hay algunos factores que afectan la concentración de OD como la presencia de sedimentos, la temperatura, el exceso de patógenos y amoníaco.

El DQO es el parámetro que permite medir el contenido de materia orgánica en aguas naturales y aguas residuales industriales. En la figura 8 se observa que al ingreso del sistema de tratamiento se obtuvo un DQO de 44800 mg/L, mismo que es menor en comparación con estudios realizados en Malasia por Kamyab et al., (2016) y Zainal et al., (2017), que alcanzaron un rango entre 15000-100000 mg/L, con una media de 51000 mg/L; en tanto que en Indonesia, Sabilil & Agus, (2021) registraron valores de DQO entre 15103-65100 mg/L, desemparejando a Ecuador con un estudio ejecutado

por Moreno en (2015) que obtuvo un DQO de 6813 mg/L, que en comparación con esta investigación resulto menor. Un factor que influye en el análisis de DQO es la cantidad de fruta fresa procesada, donde una tonelada de fruta fresa procesada produce 0.6 toneladas de POME. Statista reporta en 2020, que países como Indonesia y Malasia produjeron 42.50 y 19 millones de toneladas de aceite, generando un POME con elevado contenido orgánico, en comparación con Ecuador que genero 0.54 millones de toneladas. Islam et al., (2019) y Shukla et al., (2021), indican que un incremento en la DQO revela la presencia de elevada materia biodegradable como no biodegradables, y por ende determina el grado de contaminación del agua. Sin embargo, en el punto de descarga al río se obtuvo un DQO de 180 mg/L que contrastando con la normativa ambiental que establece un valor máximo permisible de 200 mg/L, se evidencia que si cumple.

Los sólidos totales presentaron un valor de 61100 mg/L (figura 9) al ingreso del sistema de tratamiento, este resultado concuerda con lo descrito por Shazzelyn et al., (2015) y Liew et al., (2021) que en sus estudios obtuvieron valores entre 46900-64200 mg/L, sin embargo, luego de transcurrir por el sistema de tratamiento biológico, el cual está conformado por las fases: anaeróbica, facultativa y aeróbica, se determinó en el punto de descarga (Laguna L12) un valor promedio de 623 mg/L, que comparando con 1600 mg/L valor establecido por la norma de calidad ambiental, se evidencia que cumple con el parámetro sólidos totales.

Un estudio desarrollado por Zainal et al., (2017b) mostro que, al iniciar el tratamiento biológico, el contenido de aceites y grasas permaneció entre 4000-6000 mg/L, mientras que en el punto de descarga no revelo contenido de aceites y grasas. Dichos resultados se ajustaron parcialmente con esta investigación, ya que el contenido de aceites y grasas que se muestra en la figura 10, mostro un valor de 8075 mg/L y

ventajosamente desde la laguna L-10 hasta L-12 (punto de descarga) hubo ausencia de AG, lo cual cumple con la norma ambiental que establece un límite máximo permisible de 30 mg/L para descargar a un cuerpo de agua dulce.

Posterior a la caracterización fisicoquímica, se procedió al aislamiento de cepas bacterianas presentes en el POME. Las características morfológico macroscópica, según Jung & Hoilat, (2021) es accesible, ya que la utilización del medio de cultivo MacConkey, diferencia a los organismos Gram negativos; donde la fermentación de la lactosa produce ácido láctico que disminuye en pH del agar permitiendo crecimiento de colonias rosadas, mientras que si es lactosa negativa sus colonias serán de color blanco. Este estudio permitió el aislamiento de 16 cepas Gram negativas, únicamente con un sondeo de muestras sólidas y líquidas a una profundidad de 30-50 cm, resultados que se asemejan con Guan *et al*, (2020) quienes mencionan que los sedimentos contienen mayor diversidad bacteriana, al igual que, en el agua también existe la presencia de comunidades microbianas de acuerdo con la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno.

Las pruebas bioquímicas (batería corta) se emplearon para identificar bacterianas Gram negativas, revelándose resultados positivos y negativos para citrato, urea, fermentación de glucosa, fermentación de sacarosa, motilidad y oxidasa. Los resultados negativos son un comportamiento característico de los microorganismos no fermentadores, debido a que no poseen la capacidad enzimática para descarboxilar aminoácidos como arginina o lisina. Según Watson (s.f.) y Yauri (2021), emplear agar citrato permite determinar si el organismo puede emplear citrato como única fuente de carbono, donde la enzima citrasa hidroliza el citrato en ácido oxaolacético y ácido acético, pronto el primer ácido producido se hidroliza en ácido pirúvico y dióxido de carbono, finalmente el dióxido de carbono reacciona con los componentes del medio

para producir un compuesto alcalino tornando el color del medio de verde a azul. En esta investigación se obtuvo que, de las 16 cepas, 9 resultaron positivas revelando color azul, entre tanto las 7 cepas mantuvieron el color verde reflejando negativo para citrato.

La prueba ureasa fue desarrollada para diferenciar bacilos entéricos, que Sagal en (2021), mencionó que la urea es producto de la descarboxilación de aminoácidos. En este estudio, se obtuvo un resultado positivo únicamente a una cepa, visualizando un cambio de coloración de amarillo a rosa. Los resultados concuerdan con lo descrito por Bailey & Tille en (2014), mencionaron que el proceso de hidrólisis de la urea da la formación de amoníaco y CO₂, donde la formación del amoníaco alcaliniza el medio originando un cambio de coloración de amarillo a rosa.

Los resultados positivos en motilidad, se detectó como una zona de enturbiamiento alrededor del medio, en este estudio se obtuvo que, de las 16 cepas, 8 resultaron positivo, visualizando difuminación en el medio. Estudios realizados por Petersen et al., (2021) confirman que el enturbiamiento se debe a que la bacteria posee flagelos y tiene la capacidad de alejarse del punto inoculado.

Tras las pruebas bioquímicas se identificó, *Pseudomonas* spp. en un porcentaje de 37.53%; *Escherichia coli* en un porcentaje de 24.97%; *Enterobacter cloacae* 18.70%; *Aeromonas* spp. 12.54%; *Vibrio* spp. 6.27%; de la laguna facultativa L-8; contrastando con un estudio realizado por Bala, Lalung, & Ismail, (2014) que aislaron del POME, *Micrococcus luteus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Providencia vermicola*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus subtilis*, del mismo modo en una investigación realizada por Imo, & Ihejirika, (2021), las bacterias aisladas de muestras tomadas del POME en diferentes etapas de descomposición incluyeron *Bacillus subtilis*, *Clostridium* spp., *Streptococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium* spp., y *Cellulomona* ssp.; donde la alta población de bacterias en el

POME, según Hii et al., (2011) probablemente puede estar relacionada con la contaminación derivada de la falta de higiene en las fábricas, manipulación en los procesos de extracción de aceite o asociados al hecho de que el POME es rico en carbohidratos, proteínas, compuestos nitrogenados, minerales, lípidos, celulosa, lignina y hemicelulosa, compuestos que permiten el crecimiento de hongos y bacterias.

Carpio (2014), menciona que los parámetros indicadores en la determinación de la contaminación por materia orgánica en el agua, está basado en la cantidad de oxígeno necesario para descomponer los residuos orgánicos, tales como el DQO y DBO₅. Además, Cazaudehore et al., (2019); Berdasarkan et al., (2022) destacan en sus estudios, que el método para determinar el DQO fue la utilización del dicromato de potasio, donde el fundamento del método consiste que, en condiciones controladas, ciertos materiales presentes en el agua se oxidan con un exceso de dicromato de potasio en medio ácido y presencia de sulfato de plata y mercurio. Y el exceso de dicromato es valorado con el sulfato de hierro o amonio. En esta investigación se evaluó la biodegradación de materia orgánica empleando el método HACH 8000 que usó viales que contienen los reactivos anteriormente nombrados. Los análisis de DQO, mostraron que de las cinco cepas correspondientes a *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Aeromonas* spp., y *Vibrio* spp.; identificadas en las figuras 24 y 25, muestra que *Enterobacter cloacae* (5 mL) y *Aeromonas* spp. (8 mL), exhibieron un porcentaje de reducción moderado de la DQO durante las primeras 24 horas. Se obtuvo que, a las 48 horas, aumento el porcentaje de eliminación de DQO con la aplicación de *Pseudomonas* spp. (5 mL) y *Aeromonas* spp. (8 mL) generando una reducción de la DQO del 18 % y 39 % respectivamente. El mayor porcentaje de reducción de la DQO se alcanzó a las 432 horas, únicamente *Pseudomonas* spp. (5 y 8 mL), este género de bacteria gramnegativa se estableció como principal cepa degradadora de carga

orgánica presente en el efluente en estudio, mostrando un porcentaje de reducción de la DQO de 46.5% en un volumen de 5 mL y 62.1 % para un volumen de 8 mL; estudio que concuerda con Okwute et al., (2015), quienes obtuvieron resultados satisfactorios con *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, en el día 16; según su estudio de biodegradación, la enzima degradativa lipasa producida por los aislados microbianos, descomponen sustratos complejos presentes en el POME, que de acuerdo con Aceves & Castañeda, (2012) mencionan que las lipasas son enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis parcial y total, ventaja que ayuda en el tratamiento de efluentes industriales, específicamente en la degradación y remoción de sustratos grasos y orgánicos. Esta investigación concuerda a su vez con un estudio realizado por Antay & Tuku, (2017), ellos encontraron que *Pseudomonas* spp. mostró la mayor DBO (53,33%) y DQO (47,37%), exhibiendo así que el género *Pseudomonas* es un microorganismo degradador de POME, mismo que puede aplicarse en técnicas de biorremediación ambiental. Además, de acuerdo con Agualimpia et al., en 2016 demostraron que su estudio enfocado en la bioaumentación con bacterias exógenas como: *Candida* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., fue un método eficiente en la reducción de contaminantes orgánicos en POME, confirmando también en este estudio que el género *Pseudomonas* spp., mejora el rendimiento degradativo debido a la presencia de lipasas, proteasas y lacasas.

En las figuras 24 y 25, se muestra la disminución del DQO de acuerdo con la cepa, tiempo y volumen empleados, visualizando que la cepa 1 generó un mejor porcentaje de DQO. Luego de ejecutar el análisis estadístico, priorizando la disminución de la DQO, se obtuvo que la combinación que abarcaba la cepa 1 con un volumen de 8 mL en un tiempo de 432 h mostró diferencia significativa frente a las 59 combinaciones analizadas (figura 28). Donde de acuerdo con las hipótesis planteadas, al obtener un p valor menor

α ($0,001 < 0,05$), se rechazó la hipótesis nula (H_0 : Las bacterias Gram negativas autóctonas aisladas y aplicadas *in vitro*, no remueven eficientemente la carga orgánica presente en el efluente proveniente de la planta procesadora de aceite de palma.) y se aceptó la hipótesis alternativa (Las bacterias Gram negativas autóctonas aisladas y aplicadas *in vitro*, remueven eficientemente la carga orgánica presente en el efluente proveniente de la planta procesadora de aceite de palma).

Capítulo V: Conclusiones

Se efectuó la caracterización fisicoquímica del agua residual proveniente del proceso de extracción de aceite de palma, logrando obtener resultados de Potencial de Hidrógeno (pH) de 7.2 U pH, Temperatura (T) de 28.2 °C, Oxígeno Disuelto (OD) con un valor de 1.84 mg/L, Sólidos Totales (ST) de 623 mg /L, Aceites y grasas (AG) de 0 mg/L, y Demanda Bioquímica de Oxígeno (DQO) con 180 mg/L, valores que cumplen con la norma de calidad ambiental.

Se aislaron cinco cepas bacterianas Gram negativas de la laguna facultativa L-8: *Pseudomonas* spp. en un porcentaje de 37.53%; *Escherichia coli* en un porcentaje de 24.97%; *Enterobacter cloacae* 18.70%; *Aeromonas* spp. 12.54%; y *Vibrio* spp. 6.27%.

Mediante la evaluación *in vitro* de la capacidad de remoción orgánica en el agua residual industrial aplicando bacterias Gram negativas autóctonas como *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp., con un volumen de 5 mL en un tiempo de 432 h, se logró una disminución de la DQO con porcentajes de remoción de 46.5%, 36.9%, 16.35%, 18.1%, 44.4% correspondientemente, y con un volumen de 8 mL en un tiempo de 432 h, se consiguió una disminución de la DQO con porcentajes de remoción de 62.1%, 22.0%, 23.5%, 41.9%, 24.3% respectivamente.

Los resultados del análisis estadístico muestran que la aplicación de la cepa 1 correspondiente a *Pseudomonas* spp., con un volumen de 8 mL, y evaluado en un tiempo de 432 h, resulto ser el tratamiento que logrando mayor remoción orgánica con un porcentaje de 62.1%.

El mejor tratamiento (Cepa 1: *Pseudomonas* spp.) obtenido en la remoción orgánica por el análisis de la DQO mostro valores máximos de pH y temperatura, con valores de 5.01-5.4 (U pH) y 26.01°C respectivamente.

Capítulo VI: Recomendaciones

Se recomienda efectuar inóculos mixtos en diferentes combinaciones, con el fin de optimizar el rendimiento en la remoción orgánica y obtener mayores tasas de reducción de la DQO.

Se recomienda implementar el estudio de DBO_5 , mismo que es utilizado para cuantificar la contaminación del agua por la presencia de materia orgánica biodegradable, que al poseer valores de DQO y DBO_5 , se podría calcular el índice de biodegradabilidad de las aguas residuales industriales.

Se recomienda desarrollar otras investigaciones con las cepas aisladas para determinar su eficiencia y capacidad de biorremoción de otros tipos de contaminantes.

Se recomienda efectuar una identificación molecular de las cepas bacterianas aisladas, con el fin de profundizar más la investigación y obtener datos sobre los posibles metabolitos o enzimas producidas por las cepas aisladas, su patogenicidad, además de otros factores que pueden afectar el proceso de una u otra manera.

Capítulo VII: Bibliografía

- (FAO), F. and A. O. (n.d.). 3. PROCESAMIENTO DEL ACEITE DE PALMA. Retrieved January 17, 2022, from <https://www.fao.org/3/y4355e/y4355e04.htm>
- Althausen, M. (2016). Palm Oil Mill Effluent Treatment-Converting a Residue into a Resource. *Revista Palmas*, 37, 31–37.
- Anuar, M. A. M., Amran, N. A., & Ruslan, M. S. H. (2021). Optimization of Progressive Freezing for Residual Oil Recovery from a Palm Oil-Water Mixture (POME Model). *ACS Omega*, 6(4), 2707–2716.
https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.0C04897/ASSET/IMAGES/LARGE/AO0C04897_0011.JPEG
- Agualimpia, B., Otero, J., & Zafra, G. (2016). Evaluation of native microorganisms for biodegradation of oil and grease in palm oil refinery effluents. *Biotechnology Applied*, 1221–1226. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=68552>
- Antai, S., & Tiku, D. (2017). Potenciales de biodegradación de efluentes de molinos de aceite de palma entre microorganismos locales aislados. *Human Journals*, 8(1), 2–14.
https://www.researchgate.net/publication/321724048_Palm_Oil_Mill_Effluent_Biodegradation_Potentials_among_Local_Isolated_Microorganisms
- Arce, A. (2010). Serie autodidáctica de medición de la Calidad del Agua. Muestreo y preservación de grasas y aceites, y determinación en campo de pH, temperatura y materia flotante. *Comisión Nacional Del Agua*, 27.
http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd67/fundamentos_tecnicos.pdf
- Appels, L., Lauwers, J., Degreve, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K., van Impe, J., &

- Dewil, R. (2011). Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(9), 4295–4301. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2011.07.121>
- Awasthi, M. K., Guo, D., Awasthi, S. K., Wang, Q., Chen, H., Liu, T., Duan, Y., Soundari, P. G., & Zhang, Z. (2020). Recent Advances in Phytoremediation of Toxic Metals from Contaminated Sites: A Road Map to a Safer Environment. In *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety: Vol. II*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3426-9_4
- Bala, J., Lalung, J., & Ismail, N. (2014). Biodegradation of Palm Oil Mill Effluent (POME) by bacterial. *British Microbiology Research Journal*, 4(12), 1440–1450. <https://doi.org/10.9734/bmrj/2014/12008>
- Bailey, S., & Tille, P. (2014). *Diagnostic Microbiology* (Elsevier Inc., Vol. 13).
- Becker, J., Caldwell, G., & Zachgo, E. (1996). *Biotechnology A Laboratory Course* (2nd ed.). Academic Press. <https://b-ok.lat/book/665668/e3a74d>
- Bernal, F. (2011). *El Cultivo de la Palma de Aceite y su Beneficio: Guía General para el Nuevo Palmicultor* (2001 Bogotá : Fedepalma - Cenipalma (ed.)).
- Britania s.a. (n.d.). *Mac Conkey Agar*. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707267ecda2.pdf
- Britania s.a. (2008). *Nutritivo Agar*. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707641dee11.pdf
- Brown, A., & Smitt, H. (2003). Benson's Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology. In *Detecting Pathogens in Food* (Thirteenth). <https://doi.org/10.1016/B978-1-85573-670-2.50011-7>

- Carpio, P. (2014). Análisis *in vitro* de la capacidad de remoción de materia orgánica de aguas residuales procedentes de la matanza y faenamiento de ganado, mediante la utilización de quitosano. Universidad Politécnica Salesiana.
- Chan, Y. J., Chong, M. F., & Law, C. L. (2010). Effects of temperature on aerobic treatment of anaerobically digested palm oil mill effluent (POME). *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49(15), 7093–7101.
<https://doi.org/10.1021/IE901952M>
- Cheah, W. Y., Show, P. L., Juan, J. C., Chang, J. S., & Ling, T. C. (2018). Microalgae cultivation in palm oil mill effluent (POME) for lipid production and pollutants removal. *Energy Conversion and Management*, 174, 430–438.
<https://doi.org/10.1016/J.ENCONMAN.2018.08.057>
- Checa, A. (2018). *Método: Medios de cultivo sólidos agar o agarosa – Conogasi*. CONOGASI. <http://conogasi.org/articulos/metodo-medios-de-cultivo-solidos-agar-o-agarosa/>
- Chew, C. L., Low, L. E., Chia, W. Y., Chew, K. W., Liew, Z. K., Chan, E. S., Chan, Y. J., Kong, P. S., & Show, P. L. (2021). Prospects of Palm Fruit Extraction Technology: Palm Oil Recovery Processes and Quality Enhancement. *Food Reviews International*, 00(00), 1–28. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1890117>
- Choong, Y. Y., Chou, K. W., & Norli, I. (2018). Strategies for improving biogas production of palm oil mill effluent (POME) anaerobic digestion: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 2993–3006.
<https://doi.org/10.1016/J.RSER.2017.10.036>
- Cazaudehore, G., Schraauwers, B., Peyrelasse, C., Lagnet, C., & Monlau, F. (2019). Determination of chemical oxygen demand of agricultural wastes by combining acid

- hydrolysis and commercial COD kit analysis. *Journal of Environmental Management*, 250, 109464. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2019.109464>
- David, J., Lalung, J., Ali, A., Al-Gheethi, S., Hossain, K., & Ismail, N. (2018). Microbiota of palm oil mill wastewater in Malaysia. *Tropical Life Sciences Research*, 29(2), 131–163. <https://doi.org/10.21315/tlsr2018.29.2.10>
- Delgado, F. (2014). *DESCRIPCION DETALLADA DEL PROCESO DE EXTRACCION DE ACEITE DE PALMA MEJORADO*. <https://propalma.webcindario.com/procesomejorado.htm>
- EMERSON. (2009). Dissolved Oxygen Measurement in Wastewater Treatment. *Water and Wastewater Industry*, January, 1–4.
- Faife, E., Roget, D., Fandiño, C. A., Pérez, I., Hoz, Y., Tortoló, K., & Michelena, G. (2018). Empleo de microorganismos eficientes como alternativa para el tratamiento de residuales. Revisión bibliográfica. *ResearchGate-ICIDCA Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 52(3). https://www.researchgate.net/publication/339916510_Empleo_de_microorganismos_eficientes_como_alternativa_para_el_tratamiento_de_residuales_Revision_bibliografica
- Fernández, C. (2018). *Clarificación Dinámica: un nuevo panorama tecnologico para el proceso de extraccion de aceite palma en Colombia | Fedepalma*. Cenipalma. <https://web.fedepalma.org/clarificacion-dinamica>
- Fuentes, R., Ramos, J., Jiménez, M., & Esparza, M. (2015). Characterization of the dissolved organic matter in groundwater from the Toluca valley by 3-D fluorescence spectrophotometry. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 31(3), 253–264. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v31n3/v31n3a5.pdf>

- Gabino, R. (2018). *Opuntia ficus-indica* como coagulante para remoción de sólidos suspendidos totales del efluente de beneficio en avícola La Chacra [Universidad Continental].
https://repositorio.continental.edu.pe/bitstream/20.500.12394/5029/2/IV_FIN_107_T E_Gabino_Curinahui_2018.pdf
- González, R. (2018). *Introducción a los Bioprocesos*.
<https://doi.org/10.5281/ZENODO.1295737>
- Graus. (2021). *Significado de Temperatura (Qué es, Concepto y Definición) - Significados*. <https://www.significados.com/temperatura/>
- Guaman, A. (2015). "EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE MICROORGANISMOS NATIVOS EN EL TRATAMIENTO DE POZAS SÉPTICAS DE UNA GRANJA PORCINA DEL CANTÓN PIÑAS, PROVINCIA EL ORO. AÑO 2015"
[UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK].
<https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/1477/1/TESIS ME.pdf>
- Hartley, C. W. S. (Charles W. S. (1983). *La palma de aceite* (Longman Group Limit...).
Compañía Editorial Continental.
- Hii, K., Yeap, S., & Mashitah, M. (2011). Cellulase production from palm oil mill effluent in Malaysia: Economical and technical perspectives. *Engineering in Life Sciences*, 7–28. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000228>
- Imo, E. O., & Ihejirika, C. E. (2021). Microbial load and biodegradation of palm oil mill effluent (POME) by microorganisms at different stages of discharge. *International Journal of Environmental Quality*, 44, 9–17. <https://doi.org/10.6092/issn.2281-4485/11667>

- Islam, M. M. M., Shafi, S., Bandh, S. A., & Shameem, N. (2019). Impact of environmental changes and human activities on bacterial diversity of lakes. *Freshwater Microbiology: Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems*, 105–136. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00003-7>
- Izzah, N., Aziz, H. A., & Hanafiah, M. M. (2017). THE POTENTIAL OF PALM OIL MILL EFFLUENT (POME) AS A RENEWABLE ENERGY. *Acta Scientifica Malaysia (ASM)-Journal Homepage*, 1(2), 9–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.26480/asm.02.2017.09.11>
- Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., & Ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. *Biodegradation - Life of Science*. <https://doi.org/10.5772/56194>
- Junta Andalucía. (2018). *Metodología para declarar un suelo contaminado*. https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Estado_Y_Calidad_De_Los_Recursos_Naturales/Suelo/Criterios_pdf/Muestreo.pdf
- Khadaroo, S. N. B. A., Poh, P. E., Gouwanda, D., & Grassia, P. (2019). Applicability of various pretreatment techniques to enhance the anaerobic digestion of Palm oil Mill effluent (POME): A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(5). <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2019.103310>
- Kamyab, H., Chelliapan, S., Din, M. F. M., Rezanian, S., Khademi, T., & Kumar, A. (2018). Palm Oil Mill Effluent as an Environmental Pollutant. *Palm Oil*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.75811>
- Kulshreshtha, S. (2012). Current Trends in Bioremediation and Biodegradation. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 03(07). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000e114>

- Lok, X., Chan, Y. J., & Foo, D. C. Y. (2020). Simulation and optimisation of full-scale palm oil mill effluent (POME) treatment plant with biogas production. *Journal of Water Process Engineering*, 38(July). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101558>
- MAE. (2015). REFORMA TEXTO UNIFICADO LEGISLACION SECUNDARIA, MEDIO AMBIENTE, LIBRO VI, Decreto Ejecutivo 3516. *REFORMA TEXTO UNIFICADO LEGISLACION SECUNDARIA, MEDIO AMBIENTE, LIBRO VI, Decreto Ejecutivo 3516, 0*, 18–34. <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/05/Acuerdo-097.pdf>
- mdmcientífica. (2020). SERIES DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA (UREA, CITRATO, LISINA, SIM Y TSI). www.mdmcientifica.com
- Ministerio de Comercio Exterior. (2017). *INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL SECTOR REGULACIONES SOCIALES Y AMBIENTALES IMPLEMENTADAS PARA EL SECTOR*. <https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2019/06/informe-palma-español-.pdf>
- Mohammad, S., Baidurah, S., Kobayashi, T., Ismail, N., & Leh, C. P. (2021). Palm oil mill effluent treatment processes—A review. *Processes*, 9(5), 1–22. <https://doi.org/10.3390/pr9050739>
- Moreno, M. (2015). Tratamiento de agua residual de la extracción del aceite crudo de palma para su reutilización como agua de proceso mediante un biofiltro de arena. Universidad San Francisco de Quito USFQ.
- Nahrul Hayawin, Z., Ibrahim, M. F., Nor Faizah, J., Ropandi, M., Astimar, A. A., Noorshamsiana, A. W., & Abd-Aziz, S. (2020). Palm oil mill final discharge treatment by a continuous adsorption system using oil palm kernel shell activated carbon produced from two-in-one carbonization activation reactor system. *Journal*

- of Water Process Engineering, 36. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2020.101262>
- Pal, P. (2017). Biological Treatment Technology. In *Industrial Water Treatment Process Technology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-810391-3.00003-5>
- Perez, A., & Rios, M. (2018). *Diseño Conceptual De Un Sistema De Tratamiento De Aguas Residuales Para La Planta Extractora De Aceite De Palma De La Empresa Ci Sigra S.a.* [FUNDACION UNIVERSIDAD DE AMERICA].
<https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6730/1/6131008-2018-1-IQ.pdf>
- Petersen, B. D., Liu, M. S., Podicheti, R., Yang, A. Y. P., Simpson, C. A., Hemmerich, C., Rusch, D. B., & van Kessel, J. C. (2021). The polar flagellar transcriptional regulatory network in *Vibrio campbellii* deviates from canonical *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology*, 203(20). https://doi.org/10.1128/JB.00276-21/SUPPL_FILE/JB.00276-21-S0007.XLSX
- Posada, L., & Mosquera, S. (2007). BIODEGRADACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA PRESENTE EN LAS AGUAS RESIDUALES DE UNA EMPRESA DE PINTURAS [Universidad EAFIT]. In *Repositorio Institucional Universidad EAFIT* (Vol. 22, Issue 2). <https://repository.eafit.edu.co/handle/10784/362>
- Prato, J., Millán, F., Prada, C., Tanaselía, C., Lucena, M., Ríos, I., & González, L. (2019). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de aguas subterráneas de un sector rural a baja altitud en Los Andes venezolanos. *Kasmera*, 47(2), 153–173. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3556409>
- Public, A., & Health Association (APHA). (1990). Standard methods: For the examination of water and waste water. In R. Baird, A. Eaton, & E. Rice (Eds.), *Analytical Biochemistry* (23 RD EDIT, Vol. 186, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/0003->

2697(90)90598-4

Ramalho, R. (1983). *Tratamiento De Aguas Residuales* (Segunda Edición). Reverté S.A.

<https://b-ok.lat/book/10985179/23dabb>

Ratnasari, A., Zaidi, N. S., Syafiuddin, A., Boopathy, R., Kueh, A. B. H., Amalia, R., & Prasetyo, D. D. (2021). Prospective biodegradation of organic and nitrogenous pollutants from palm oil mill effluent by acidophilic bacteria and archaea.

Bioresource Technology Reports, 15, 100809.

<https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2021.100809>

Rodriguez, P. D. (2011). *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS COMO POTENCIALES AGENTES PARA BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES EN UNA EXTRACTORA DE PALMA ACEITERA* (Issue July). ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD.

Saad, M. S., Wirzal, M. D. H., & Putra, Z. A. (2021). Review on current approach for treatment of palm oil mill effluent: Integrated system. *Journal of Environmental Management*, 286, 112209. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.112209>

Sabilil, M. S., & Agus, S. E. (2021). Biomass Composition of Microalgae Local Mixed Culture using POME (Palm Oil Mill Effluent) Medium. *Research Journal of Biotechnology*, 16(5), 41–50.

https://www.researchgate.net/publication/351223891_Biomass_Composition_of_Microalgae_Local_Mixed_Culture_using_POME_Palm_Oil_Mill_Effluent_Medium

Sagar, A. (2021). Prueba de ureasa: principio, medios, procedimiento y resultado.

<https://microbiologyinfo.com/urease-test-principle-media-procedure-and-result/>

Shazzelyn, W., Sharifudin, W., Sulaiman, A., Noriznan, M., Baharuddin, A., Tabatabaei,

- M., Busu, Z., & Subbian, K. (2015). Presence of Residual Oil in Relation to Solid Particle Distribution in Palm Oil Mill Effluent. *BioResources*, 10(4), 7591–7603.
- Smith, A., & Hussey, M. (2016). Gram Stain Protocols. *American Society for Microbiology*. www.asmscience.org
- Soleimaninanadegani, M., & Manshad, S. (2014). *Enhancement of Biodegradation of Palm Oil Mill Effluents by Local Isolated Microorganisms*.
<https://doi.org/10.1155/2014/727049>
- Sood, S., Singhal, R., Bhat, S., & Kumar, A. (2011). Inoculum Preparation. *Comprehensive Biotechnology*, 230–243. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00076-8>
- Saputera, W. H., Amri, A. F., Daiyan, R., & Sasongko, D. (2021). Photocatalytic Technology for Palm Oil Mill Effluent (POME) Wastewater Treatment: Current Progress and Future Perspective. *Materials*, 14(11).
<https://doi.org/10.3390/MA14112846>
- Sutton, S. (2006, February). *Gram Staining*. The Microbiology Network.
<http://microbiologynetwork.com/the-gram-stain.asp>
- Shukla, S. K., Khan, A., & Rao, T. S. (2021). Microbial fouling in water treatment plants. *Microbial and Natural Macromolecules*, 589–622. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820084-1.00023-5>
- TMCC. (2021). *Identifying an Unknown Staphs, Strep, or Enteric*. Truckee Meadows Community College. <https://www.tmcc.edu/microbiology-resource-center/lab-protocols/unknown-identification>

- Tripathi, C. S., & Grant Allen, D. (1999). Comparison of mesophilic and thermophilic aerobic biological treatment in sequencing batch reactors treating bleached kraft pulp mill effluent. *Water Research*, 33(3), 836–846. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00260-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00260-7)
- Tuset, S. (2019). *Caracterización del agua residual*. CONDORCHEM.
<https://blog.condorchem.com/caracterizacion-del-agua-residual/>
- USEPA. (2000a). Wastewater Technology Fact Sheet Dechlorination. *Environmental Protection Agency*, 1–7. <https://www3.epa.gov/npdes/pubs/apartlag.pdf>
- USEPA. (2000b). Wastewater Technology Fact Sheet Facultative Lagoons.
Environmental Protection Agency, 1–7.
- US EPA. (2021). Oxígeno Disuelto | EPA de EE. UU. Environmental Protection Agency.
<https://www.epa.gov/caddis-vol2/dissolved-oxygen>
- Vallerie, B. (2010). Aider au développement du pouvoir d’agir des personnes en situation de handicap. *La Nouvelle Revue de l’adaptation et de La Scolarisation*, 51(3), 271. <https://doi.org/10.3917/nras.051.0271>
- Vásquez, A. (2017). *Determinación del efecto de los microorganismos eficientes para la remoción del valor de la DBO en las aguas residuales domésticas de la localidad de Japelacio – 2016*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO FACULTAD.
- Vidali, M. (2011). Bioremediation - An overview. *Journal of Industrial Pollution Control*, 27(2), 161–168.
- Watson, R. (n.d.). Laboratorio de Microbiología: MOLB 2210. Retrieved April 27, 2022, from https://www.uwyo.edu/molb2210_lab/info/biochemical_tests.htm#simmons

Wun, W. L., Chua, G. K., & Chin, S. Y. (2017). Effect of palm oil mill effluent pome treatment by activated sludge. *Journal CleanWAS*, 1(2), 06–09.

<https://doi.org/10.26480/jcleanwas.02.2017.06.09>

Yauri, M. F. (2021). Caracterización molecular de genes de resistencia a β -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 42(1).

<https://doi.org/10.26807/REM CB.V42I1.886>