

*Artículo original de investigación***Biodegradación de residuo graso industrial empleando bacterias endógenas****Diana González<sup>1</sup>, Luis Amaíz<sup>\*2</sup>, Luis Medina<sup>2</sup>, Rosmary Vargas<sup>2</sup>, Noja Izzeddin<sup>2</sup> y Oscar Valbuena<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología (FACyT).<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA-UC). Facultad de Ciencias de la Salud (FCS).  
Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

\* Autor de correspondencia (afle01@hotmail.com; leamaiz@uc.edu.ve)

**Resumen**

A nivel mundial, ha surgido preocupación por el deterioro ambiental y de salud que originan los residuos industriales, entre ellos los efluentes grasos. Al no existir una estructura para la disposición final de estos residuos, las empresas adoptan conductas de manejo, con sistemas de disposición final temporal o definitiva no acordes a la normativa. El propósito de este trabajo estuvo dirigido a dos aspectos: I- aislar cepas bacterianas lipolíticas endógenas de un residuo graso industrial (RGI) y II- tratar biológicamente dicho residuo con un consorcio bacteriano preparado con las cepas aisladas del mismo. A tales efectos, el RGI fue adicionado a un medio mínimo mineral e incubado bajo condiciones de laboratorio, obteniéndose colonias bacterianas, las cinco preponderantes, se asignaron a los géneros *Pseudomonas* (cepas 1 y 2), *Bacillus* (cepas 3 y 4) y *Enterobacter* (cepa 5). El consorcio bacteriano, una mezcla de las cepas aisladas, en 21 días y a temperatura ambiente, degradó 341,5 mg de grasa (91,4 % de degradación); la carga bacteriana superó  $10^{10}$  UFC/mL, la  $DBO_{5,20^{\circ}}$  y DQO disminuyeron en un 33,6 % y 59,8 %, respectivamente, durante el mismo lapso de tiempo. La actividad lipasa de las cepas, evaluadas a las 24 y 48 horas de tratamiento, se detectó por titulación potenciométrica de los ácidos grasos liberados, usando aceite de oliva como sustrato. La actividad enzimática específica de las cepas, con un promedio de  $0,500 \text{ mmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ , osciló entre  $0,141$  y  $0,158 \text{ mmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$  y las tasas de actividad entre  $8,8$ - $12,2 \text{ mmol} \times \text{min}^{-1}$ . El consorcio bacteriano fue efectivo en eliminar el 90 % del volumen de residuos grasos y olores desagradables de trampas de grasa de empresas procesadoras de cerdos y aves, representando una herramienta útil para el tratamiento de estos residuos.

**Palabras Claves:** Grasas, Lipasas, Biodegradación, Consorcio bacteriano.**Biodegradation of an industrial fatty residue by endogenous bacteria****Abstract**

Environmental and health deterioration induced by industrial residues constitutes a great concern throughout the world. This situation has partially evolved by the inexistence/deficiency of final discard facilities for these residues and inadequate policies adopted by the industrial companies. The aim of this study was devoted to two aspects: I- isolation of indigenous lipolytic bacteria from industrial fatty residues (IFR) and II- biodegrading these residues by a bacterial consortium prepared

with the isolated bacterial strains. To reach such goals, a minimal mineral medium was supplemented with IFR under laboratory conditions. After appropriate incubations, five bacterial strains were predominantly detected; they were assigned to *Pseudomonas* (strains 1 and 2), *Bacillus* (strains 3 and 4) and *Enterobacter* (strain 5) genera. The bacterial consortium (a mixture of the five previously isolated strains) degraded 341.5 mg of fat (91.4 % degradation) after 21 days of biotreatment, besides the bacterial load increased to values higher than  $10^{10}$  CFU/mL, and BOD<sub>5,20°</sub> and COD were reduced in 33,6 % and 59.8 %, respectively. The bacterial lipase activity was determined by potentiometric titration of the released fatty acids using olive oil as substrate, at 24 and 48 h of biotreatment. The lipase specific activity of the bacterial strains ranged from 0.141 to 0.158 mmol x min<sup>-1</sup> x μg<sup>-1</sup> (0.500 mmol x min<sup>-1</sup> x μg<sup>-1</sup> as average value), whereas lipase activity rates were estimated in the 8.8-12.2 mmol x min<sup>-1</sup> range. The bacterial consortium reduced the level of the fatty residues 90 % and totally eliminated unpleasant odors of porcine and chicken fatty residues at two industrial facilities. The bacterial consortium can be used as an useful biotechnological tool for degrading industrial fatty residues.

**Keywords:** Fat, Lipases, Biodegradation, Bacterial consortim.

## 1. Introducción

Los residuos grasos industriales generados en el sector alimentario y descargados al medio ambiente, ocasionan impacto ambiental negativo debido a la alta carga orgánica e inorgánica que éstos contienen (Saatci *et al.*, 2001; Abass *et al.* 2011). Además, generan en su descomposición, productos altamente tóxicos debido al proceso de peroxidación lipídica. Estos peróxidos causan daño celular en los animales, siendo por ello utilizado en ocasiones como indicador del estrés oxidativo y como biomarcadores de contaminación ambiental (Di Giulio, 1991). La descomposición de dichos residuos produce olores desagradables, componentes atrayentes de plagas e inclusive, podría afectar la salud de las comunidades cercanas; constituyendo así un problema de salud pública (Cirne *et al.* 2007; Chin *et al.* 2010). Para el tratamiento de residuos grasos industriales, se usan técnicas convencionales que implican procesos y adición de productos químicos de alto costo, que generalmente deterioran el medio ambiente, y que al final, generan productos recalcitrantes, requiriendo éstos últimos un tratamiento más complejo y costoso (Abass

*et al.* 2011). Actualmente, las empresas capturan y acumulan las grasas en depósitos conocidos como trampa de grasas, un sistema diseñado y construido para separar las grasas y aceites de los efluentes. Posteriormente, estos residuos grasos son almacenados en tanques y llevados a su disposición final, tal como lo indica la regulación ambiental venezolana. En la práctica, se ha evidenciado que las trampas de grasa que se construyen son pequeñas, rebasándose en poco tiempo su capacidad por los volúmenes producidos que deben tratarse. En este caso, se aplican medidas de emergencia que implica la remoción manual, siendo éste una acción repulsiva y costosa. Es por ello que en la actualidad, se ha enfatizado en la búsqueda de nuevas alternativas biotecnológicas para el tratamiento de este tipo de residuos y al mismo tiempo minimizar o detener los efectos que se mencionan. El biotratamiento es una de las alternativas empleadas, donde se utilizan las propiedades catalíticas de organismos vivos (entre ellos bacterias) para eliminar los residuos contaminantes de los ecosistemas (Thassitou y Arvanituyannis, 2001; Bhumibhamon *et al.* 2002; Kushwaha *et al.* 2011). La biodegradación de las grasas y aceites de origen biológico, que conforman

este tipo de residuo, comienza con la hidrólisis enzimática del enlace éster del triglicérido, llevado a cabo mediante lipasas excretadas por estos microorganismos, seguido por el consumo de glicerol y beta oxidación de los ácidos grasos (Bailey y Ollis, 1996; Bornscheuer, 2002; Mongkolthananuk y Dharmstithi, 2002; Gupta *et al.* 2004; Jaeger y Eggert, 2004; Singh *et al.* 2006). De tal manera, estos microorganismos son empleados con el fin de aumentar la velocidad de degradación y transformación de los contaminantes en sustancias más inocuas y asimilables y por ende disminuir la contaminación ambiental que éstos ocasionan. El uso de bacterias reduce en costos el tratamiento de estos residuos; además, las enzimas extracelulares son biodegradables y representan, en masa, entre 0,1 y 1% del sustrato a ser degradado, contribuyendo de manera despreciable a la demanda química de oxígeno del agua residual (Cammarota y Freire, 2006; Da Silva *et al.* 2009). Un aspecto importante a tomar en consideración para justificar la búsqueda de bacterias lipolíticas, está ligado a los problemas ambientales, los altos costos de los combustibles fósiles y a la demanda energética mundial generada por el uso del petróleo y sus derivados. Al respecto, la producción de combustibles alternativos (bioetanol y biodiesel), más amigables con el ambiente, parecen ser opciones válidas (Akoh *et al.* 2007; Rivera-Pérez y García-Carreño, 2007; Bajaj *et al.* 2010; Santos-Correa *et al.* 2011). De tal manera que, la primera fase en la producción de biodiesel implica la hidrólisis de la grasa a una mezcla de ácidos grasos libres y glicerol, para así posteriormente, en una segunda fase generar los ésteres metílicos o etílicos de los ácidos grasos liberados bajo condiciones apropiadas. Entre otras aplicaciones a nivel industrial, las lipasas son empleadas en las industrias farmacéuticas como aditivos a productos que facilitan la digestión, en la resolución de compuestos quirales, en la

obtención de ésteres a partir de aceites y grasas de ácidos grasos de elevada pureza con un alto rendimiento (Gunstone, 1999; Jaeger y Eggert, 2006; Jeganaesan *et al.* 2004; Sangeeth *et al.* 2011) y como agentes degradadores de residuos grasos provenientes de industrias lácteas (Mendes *et al.*, 2010). En este estudio, como estrategia de tratamiento de efluentes grasos, usualmente acumulados durante largos períodos, se plantea degradar los residuos grasos provenientes de una empresa procesadora de productos cárnicos mediante el uso de bacterias endógenas aisladas de tales residuos.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Residuo graso industrial (RGI)

El residuo graso industrial fue suministrado por una empresa procesadora de cerdos, ubicada en Valencia, Estado Carabobo, Venezuela. La muestra, viscosa, heterogénea en su consistencia, de color grisáceo y con un fuerte y desagradable olor, fue manipulada en campana extractora de gases.

### 2.2. Cultivos bacterianos suplementados con RGI

En experimentos iniciales, debido a la viscosidad del RGI, se determinó la cantidad de residuo a adicionar a 100 mL del medio de cultivo, que permitiera una adecuada agitación de los mismos. De tal manera, los cultivos en caldo nutritivo (CN, HIMEDIA, India) y medio mínimo mineral (MMM: FeSO<sub>4</sub>, 0,1 g/L; NaCl, 5 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g/L; MgCl<sub>2</sub>, 0,14 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 g/L; CaCl<sub>2</sub>, 0,058 g/L; ZnSO<sub>4</sub>, 0,013 g/L y tampón fosfato 20 mM, pH 7,0), contenían 10 g de RGI por 100 mL de medio de cultivo.

#### 2.2.1. Aislamiento de bacterias endógenas

A 100 mL de CN, esterilizado a 121°C y 15 libras de presión durante 15 min, se adicionaron 10 g de RGI incubándose el sistema a temperatura ambiente (20-24 °C)

durante 24 h. Alícuotas de este cultivo se retiraron y estriaron en placas de agar nutritivo (AN), incubándose una vez más bajo las condiciones indicadas. Las colonias bacterianas aisladas se observaron en una lupa estereoscópica (Wild M7A, Heerbrugo, Suiza) para describir su morfología macroscópica y luego de la tinción de Gram se observaron en un microscopio óptico (Nikon HFX-DX, Labophot-2, Japón).

### **2.2.1.1 Caracterización bioquímica e identificación de cepas bacterianas**

Las colonias aisladas se caracterizaron mediante los ensayos de glucosa/lactosa, catalasa, oxidasa, movilidad, Voges-Proskauer e indol (Forbes *et al.* 2004; Mac Faddin, 2004). Para la identificación de las cepas bacterianas, a nivel de género, se utilizaron las galerías API 20E, API 20NE y API 50CHB (bioMérieux, Francia), (Mac Faddin, 2004; Browns, 2009).

### **2.2.1.2 Cultivos bacterianos en caldo nutritivo**

Con la finalidad de obtener suficiente biomasa, las cepas aisladas se cultivaron individualmente en caldo nutritivo, en agitación constante, en las condiciones establecidas en la sección 2.2.1.

### **2.2.2 Biotratamiento de RGI**

El tratamiento de RGI se efectuó usando un inóculo bacteriano constituido por una mezcla (consorcio, CB) de las cepas aisladas previamente cultivadas en CN, constituido por volúmenes iguales de los cultivos respectivos de cada cepa bacteriana y preparándose tres cultivos (sistemas A1, A2, A3). El sistema A1 se utilizó para la determinación de los parámetros fisicoquímicos (grasa remanente y pH) y el biológico (carga bacteriana, UFC/mL). Este sistema (preparado por triplicado) contenía 50 mL CB y una mezcla previamente esterilizada conteniendo 10g de RGI y el volumen necesario de MMM para completar 110 mL, incubándose bajo las condiciones

señaladas en la sección 2.2.1 y retirándose alícuotas de 20 mL a las 0, 24, 48 y 72 h de incubación. El sistema A2 se utilizó para la determinación de los parámetros fisicoquímicos y biológico ya mencionados a tiempos mayores de incubación (0, 7, 14 y 21 días) y comparar los resultados con las demandas química y biológica de oxígeno (DQO y DBO<sub>5,20</sub>, respectivamente). Este sistema contenía 100 mL de CB, 20 g de RGI y el volumen necesario de MMM para completar 220 mL. El sistema A3 se utilizó para la determinación de la demandas química y biológica de oxígeno (DQO y DBO<sub>5,20</sub>, respectivamente), retirándose alícuotas a los 0,7,14, y 21 días de incubación (DQO); y 0 y 21 días de incubación (DBO<sub>5,20</sub>). La composición de este sistema fue idéntica al sistema A2. Las determinaciones de grasa, DQO y DBO<sub>5,20</sub> (métodos 5520D, 5220B y 5210B, respectivamente) se realizaron de acuerdo a lo establecido en Clesceri *et al.* 1998.

### **2.3 Determinación cuantitativa de la actividad lipolítica**

La actividad de lipasas se determinó usando una suspensión aceite de oliva como substrato y por titulación potenciométrica de los ácidos grasos liberados. A tal fin se procedió de la siguiente manera:

#### **2.3.1 Preparación del extracto enzimático**

Volúmenes (usualmente 20-25 mL) de cultivos correspondientes a cada cepa bacteriana, suministrando un total de 20 unidades de absorbancia a 540 nm, se mezclaron con 5 g de RGI y el volumen necesario de MMM para completar 55 mL, estableciéndose dos cultivos independientes, uno para su incubación durante 24 h y el otro a 48 h. Luego de incubación de acuerdo a lo establecido en la sección 2.2.2., los cultivos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min en una centrífuga (Spectrafuge 16M) y los sobrenadantes libres de células (SLC) se utilizaron para determinar la actividad

enzimática (Daniele *et al.* 2011) y cantidad de proteínas (Bradford, 1976).

### 2.3.2. Preparación del sustrato:

En una licuadora se adicionaron 15 g de aceite de oliva (El Gallo), 50 mL de goma arábica 1 % m/v (Sigma), 1,0 mL de desoxicolato sódico 8% m/v (Sigma), 65 mL de tampón fosfato 0,01M, pH 7,0 (Riedel de Haën) y el volumen de agua necesario para completar 150 mL. La mezcla se homogeneizó aplicando 5 ciclos de agitación de 5 min seguidos de enfriamiento en hielo. Las concentraciones finales de cada sustancia en el sustrato fueron: 1,0 % m/v de aceite de oliva, 0,33 % m/v de goma arábica, 0,053 % m/v de desoxicolato y 8,7 mM de fosfato.

### 2.3.3. Sistema de reacción enzimática:

El sistema enzimático se preparó mezclando 30 mL del sustrato, previamente calentado a 37 °C y ajustado a pH 9,5 mediante agregado de NaOH 0,1M inmediatamente antes del inicio del ensayo, con 1,0 mL de SLC. El sistema se incubó a 37 °C, en agitación constante, manteniendo el pH en 9,5 por titulación potenciométrica con NaOH 0,1 M, durante 20 min, registrando el volumen gastado de NaOH cada 4-5 min.

### 2.3.4. Cálculo de actividades enzimáticas:

Los datos obtenidos, mmoles de ácidos grasos liberados y los tiempos respectivos de reacción, se sometieron a análisis de regresión lineal, con la finalidad de obtener las pendientes de las rectas, las cuales representan las tasas de velocidad (mmoles de ácidos grasos liberados  $\times$  min<sup>-1</sup>) correspondientes a cada cepa. Las actividades específicas de las preparaciones enzimáticas (mmoles  $\times$  min<sup>-1</sup>  $\times$   $\mu$ g<sup>-1</sup>) se calcularon luego de determinar el contenido de proteínas en los SLC. Una unidad de

actividad lipolítica se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un  $\mu$ mol de ácidos grasos por minuto por  $\mu$ g de proteína.

### 2.4 Cuantificación de proteínas totales.

La determinación de proteínas se cuantificó mediante el método de Bradford, 1976, empleando suero albúmina bovina (100  $\mu$ g/mL) como patrón. La recta obtenida representa el promedio de tres ensayos independientes.

### 2.5 Cálculos estadísticos.

Las desviaciones estándar y la regresión lineal se determinaron aplicando el programa de Microsoft Office Excel 2007.

## 3. Resultados

### 3.1 Aislamiento e identificación de las cepas bacterianas.

En el presente estudio, cinco cepas bacterianas fueron aisladas e identificadas a nivel de género. Las características de colonias bacterianas, identificadas de acuerdo a las pruebas bioquímicas, características morfológicas de cada cepa y galerías API, se especifican en la Tabla 1. Las cepas 1, 2 y 5 son bacilos Gram (-), de los cuales las dos primeras pertenecen al género *Pseudomonas*, y la tercera al género *Enterobacter*. Las cepas 3 y 4 son bacilos Gram (+), ambas pertenecientes al género *Bacillus*.

### 3.2 Tratamiento biológico del residuo graso industrial (RGI).

La evaluación del tratamiento biológico se efectuó al determinar los parámetros fisicoquímicos (grasas, pH, DQO, DBO<sub>5,20°</sub>) y carga bacteriana.

**Tabla 1. Caracterización morfológica y bioquímica de las cepas bacterianas aisladas.**

\* Determinados mediante galerías API 20E, 20NE y 50CHB

Cepas	Pruebas Bioquímicas						Gram	Género*
	Glu/Lac	Oxidasa	Catalasa	Voges-Proskauer	Indol	Movilidad		
1	-/-	+	+	-	-	+	Bacilos (-)	<i>Pseudomonas.</i>
2	-/-	+	+	-	-	+	Bacilos (-)	<i>Pseudomonas.</i>
3	+/+	-	+	+	-	+	Bacilos (+)	<i>Bacillus.</i>
4	+/+	-	+	+	-	+	Bacilos (+)	<i>Bacillus.</i>
5	+/+	-	+	+	-	+	Bacilos (-)	<i>Enterobacter.</i>

### 3.2.1 Parámetros físicoquímicos

En la Tabla 2 se muestran los valores del consumo de grasa por los microorganismos durante el lapso de tiempo de 0 y 72 h de biotratamiento en los sistemas A1. En estos ensayos, las cepas bacterianas fueron capaces de degradar 227,6 mg de RGI en 72h de incubación, representando un porcentaje de remoción de 53.2 %. La carga bacteriana se incrementó desde  $2.83 \times 10^7$  a  $4.60 \times 10^8$  UFC/mL y los valores de pH se mantuvieron en el intervalo de 7.0 a 7.1; lo que probablemente indica que éste sea el pH óptimo para el desarrollo de los microorganismos. En un segundo ensayo

(sistema A2), se evaluó el biotratamiento de RGI en el lapso de tiempo de 0 a 21 días de incubación. Los valores mostrados en la Tabla 3 indican que los microorganismos endógenos fueron capaces de degradar 341.5 mg de RGI en 21 días de incubación, lo que representa un porcentaje de remoción de 91.4 %. Adicionalmente, la carga bacteriana se incrementó desde  $51 \times 10^6$  UFC/mL hasta  $>10^{10}$  UFC/mL. La DBO<sub>5,20</sub> y DQO, mostraron una reducción de 33.6 % y 59.8 % respectivamente, lo que indica que estos microorganismos pueden degradar parte de la materia orgánica presente en el RGI en las condiciones establecidas en el laboratorio.

**Tabla 2.** Contenido de grasa, carga bacteriana y pH en los sistemas bacterianos (A1) respecto al tiempo de incubación.

Tiempo (h)	Carga bacteriana (UFC/mL) $\times 10^{-7}$	Parámetros		pH
		Grasa remanente (mg)	Grasa consumida (mg)	
0	2.87 $\pm$ 2.05	427.6 $\pm$ 70.8 [100%]	0	7.1
24	9.53 $\pm$ 0.99	360.7 $\pm$ 80.9 [84.3%]	66.9 $\pm$ 23.9 [15.7%]	7.0
48	36.0 $\pm$ 29.82	254.8 $\pm$ 85.4 [59.6%]	172.8 $\pm$ 15.1 [40.4%]	7.0
72	46.0	200 [46.8]	227.16 [53.2%]	7.0

**Nota:** Los valores en corchetes representan el porcentaje de grasa remanente o consumida en 20mL de muestra analizada.

**Tabla 3.** Parámetros fisicoquímicos y biológicos durante el biotratamiento RGI.

Parámetros							
Sistema	Tiempo (días)	UFC/mL	Grasa remanente (mg)	Grasa consumida (mg)	pH	DQO (mgO <sub>2</sub> /L)	DBO <sub>5,20°</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)
A2 y A3	0	51x10 <sup>6</sup>	373,6	0	7,0	37.091	11.900
	7	36,4x10 <sup>7</sup>	101,9	271,8 (72,7%)	7,2	29.808	-
	14	14,4x10 <sup>8</sup>	57,9	315,9 (84,5%)	7,1	22.096	-
	21	>10 <sup>10</sup>	32,3	341,5 (91,4%)	7,0	14906	7.900

**Nota:** los números entre paréntesis indican el porcentaje de remoción de grasa.

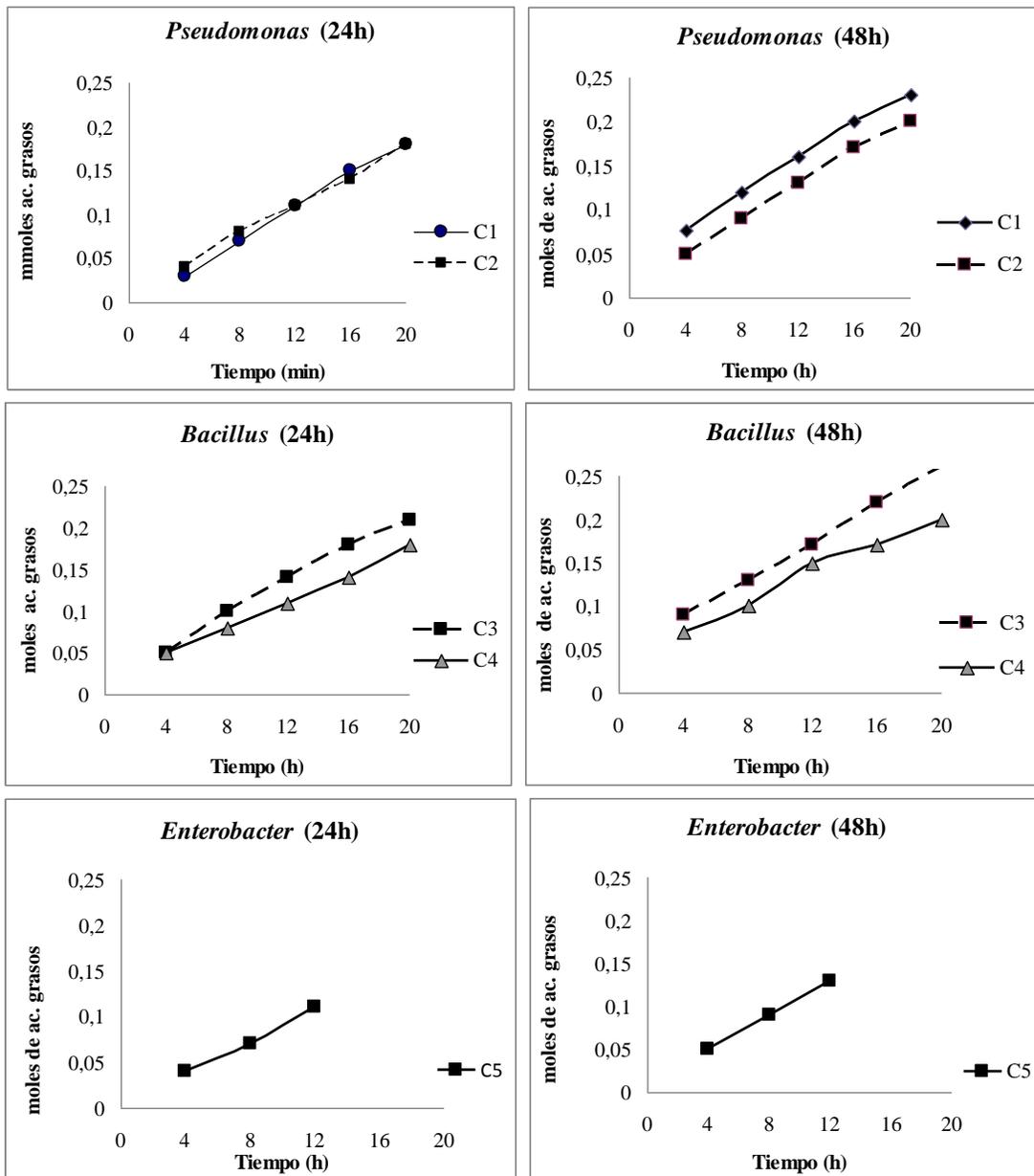
### 3.2.2 Determinación cuantitativa de la actividad lipolítica.

La actividad enzimática se determinó por titulación potenciométrica de los ácidos grasos liberados empleando NaOH como agente titulante y aceite de oliva como sustrato. Estas actividades lipolíticas se detectaron a 24 y 48 horas de crecimiento bacteriano en los SLC de los cultivos evaluados. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1 y Tabla 4. Las gráficas de la figura 1, muestran la actividad lipolítica total *in vitro* obtenida para cada una de las cepas aisladas a los tiempos de incubación indicados. Dichas actividades

incrementaron linealmente con el tiempo hasta alcanzar valores máximos aproximados a 0,25 mmoles de ácidos grasos liberados a las 48 horas de tratamiento bacteriano. De las cinco cepas aisladas, la cepa 3, perteneciente al género *Bacillus*, mostró la mayor actividad lipolítica (0,21 y 0,26 mmoles) a las 24 y 48 h de incubación respectivamente, mientras la cepa 5, perteneciente al género *Enterobacter*, mostró valores mínimos (0,13 y 0,13 mmoles). El resto de las cepas bacterianas mostraron valores de actividad cercanos 0,18 mmoles a los tiempos de tratamiento indicados.

**Tabla 4.** Actividad enzimática específica de los SLC provenientes de las cepas bacterianas aisladas a las 24 y 48 horas de biotratamiento.

Cepa	Proteínas		Actividad enzimática total		Actividad enzimática específica	
	μg x mL <sup>-1</sup>		mmol x min <sup>-1</sup>		mmol x min <sup>-1</sup> x ug <sup>-1</sup>	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1	131.5	144.5	18.8±1.4	22.8±5.9	0.143	0.158
2	114.3	141.0	17.4±1.3	19.4±1.8	0.152	0.138
3	137.9	133.8	21.0±1.7	24.4±7.7	0.152	0.182
4	119.7	134.7	17.8±3.1	19.0±3.1	0.148	0.141
5	120.5	148.8	17.6±1.5	21.2±1.7	0.146	0.142



**Figura 1.-** Actividad lipolítica de las cepas aisladas del RGI a 24 y 48 horas de incubación. Valores de regresión lineal: Para **24h**; **Cepa 1:**  $Y=0,0094x-0,0014$ ;  $R^2= 0,9995$ ; **Cepa 2:**  $Y=0,0087x+0,0062$ ;  $R^2= 0,9953$ ; **Cepa 3:**  $Y=0,0105x+0,01$ ;  $R^2= 0,9927$ ; **Cepa 4:**  $Y=0,0089x+0,007$ ;  $R^2= 0,9948$ ; **Cepa 5:**  $Y=0,0088x-0,0053$ ;  $R^2= 0,9948$ . Para **48h**; **Cepa 1:**  $Y=0,0114x + 0,0215$ ;  $R^2= 0,9825$ ; **Cepa 2:**  $Y=0,0097x + 0,0141$ ;  $R^2= 0,9906$ ; **Cepa 3:**  $Y=0,0122x + 0,0289$ ;  $R^2= 0,9808$ ; **Cepa 4:**  $Y=0,0095x + 0,0244$ ;  $R^2= 0,974$ ; **Cepa 5:**  $Y=0,0106x + 0,0060$ ;  $R^2= 0,9936$ .

#### 4. Discusión

Luego de incubar el RGI en un medio mínimo mineral estéril, en condiciones de laboratorio, el crecimiento bacteriano se evidenció por la turbidez desarrollada en los medios de cultivo y posterior aislamiento de colonias bacterianas. Cinco fueron los morfotipos preponderantes en placas de agar AN, los cuales fueron asignados a los géneros *Pseudomonas* (cepas 1 y 2), *Bacillus* (cepas 3 y 4) y *Enterobacter* (cepa 5), (tabla 1). Estos tres géneros bacterianos han sido ampliamente utilizados en proceso de degradación de aguas residuales y residuos grasos (Mendes *et al.* 2006; Ruggieri *et al.* 2008; Browns, 2009; Cipinyte *et al.* 2009). Generalmente, las cepas pertenecientes al género *Enterobacter* son indicadores de contaminación sanitaria (heces y orina de origen animal); su presencia en tal residuo es de esperarse debido a la procedencia del material que se está tratando. Prasad y Manjunath, 2011, reportaron que un consorcio bacteriano conformado por *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Acinetobacter* degradaron un 99% el contenido graso y la  $DBO_{5,20}$  al biotratar residuos grasos provenientes de diferentes orígenes (domésticos, industrial, mataderos, entre otros.). Es importante resaltar que el residuo tratado en este estudio, es un material que proviene de una procesadora de productos cárnicos y que además de contener grasas, también contiene carbohidratos, proteínas y otros componentes que, eventualmente podrían coadyuvar a la viabilidad de la población microbiana presente. Bajo estas condiciones, las bacterias fueron capaces de degradar en un alto porcentaje la grasa contenida en ese residuo (53,2 % a las 72 h de tratamiento y 91,4 % a los 21 días, tablas 2 y 3, respectivamente) y lograron reducir en un alto porcentaje (60 %) el valor de la DQO, sin embargo la remoción de la  $DBO_{5,20}$  solo alcanzó el 33 % (tabla 3). El valor relativamente alto de la  $DBO_{5,20}$

remanente (67 %) podría ser explicado por la persistencia de componentes no lipídicos en el RGI (polisacáridos, proteínas), debido a: cantidades inadecuadas de las enzimas encargadas de su degradación (glucanasas, proteasas); condiciones experimentales no apropiadas para la actividad enzimática, o por un efecto del alto contenido graso que interfiere físicamente con la degradación de tales componentes al bloquear los enlaces químicos que atacan dichas enzimas. El contenido de grasa remanente a tiempo cero suministra un dato que permite calcular la cantidad de grasa presente en el RGI. Tomando el valor promedio (400,6 mg) de las determinaciones señaladas en las tablas 2 (427,6 mg) y 3 (373,6 mg), equivalentes a 20 mL de 110 mL de cultivo, conteniendo 10 g de RGI, se obtiene un valor de 22 g de grasa por 100 g de RGI. La diferencia en los valores individuales a tiempo cero, es debida a la consistencia heterogénea del RGI, lo cual puede apreciarse en la desviación estándar reportada en la Tabla 2.

El comportamiento de los SLC, en los ensayos para la determinación cuantitativa de la actividad de lipasas (figura 1), indicó que en todos los casos el orden cinético de reacción, respecto al sustrato, fue cero, condición necesaria para la determinación cuantitativa de actividades enzimáticas (Daniele *et al.*, 2011). Las tasas de actividad lipolítica se calcularon en base a las curvas de regresión lineal, obtenidas con los mmoles de ácidos grasos liberados, en el intervalo de tiempo de 0 a 20 minutos, determinándose las pendientes respectivas, las cuales son equivalentes a las tasas de actividad expresadas como  $\text{mmol} \times \text{min}^{-1}$ . Los valores calculados, en todos los casos, oscilaron en el intervalo de 8,7-11,4  $\text{mmol} \times \text{min}^{-1}$  (figura 1). Además, la presencia de actividad lipolíticas en los SLC, indica que las bacterias excretan lipasas activas al medio de cultivo (Valencia, 2009).

En la tabla 4, se evidencia que las actividades específicas de cada una de las

cepas aisladas a 24 y 48 h de biotratamiento, mostraron actividades específicas ubicadas en el intervalo de 0,141 y 0,158  $\text{mmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ , no existiendo diferencias notables entre los valores a las 24 y 48 h, ni entre las diferentes cepas bacterianas. Aunque existen reportes que indican que cepas del género *Bacillus* son los mejores productores de enzimas lipolíticas y las más adecuadas para degradar residuos grasos (Rivera y García, 2007), Hasanuzzaman et al. 2004; Cipinyte et al. 2009, señalan que microorganismos del género *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Burkholderia*, son también capaces de degradar residuos grasos, pero su actividad lipolítica es baja debido a que los ácidos grasos de cadenas largas, productos de la hidrólisis enzimática, se acumulan en el medio limitando dicha actividad. En nuestro caso, bajo las condiciones experimentales utilizadas, no pareciese haber diferencias notables entre los géneros bacterianos evaluados, en términos de producción de lipasas e hidrólisis de residuos grasos.

Tomando en consideración el promedio de las actividades específicas ( $0,15 \text{ mmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ ), la cantidad teórica de grasa (expresada como tripalmitina con un peso molecular de 800 g/mol) que podría degradar una mezcla de los SLC de las cepas, podría ascender a 40 Kg por cada gramo de proteínas bacterianas extracelulares presentes en el medio de cultivo ( $140,6 \mu\text{g}/\text{mL}$ , promedio del contenido de proteínas/mL de los SLC a las 48 h de incubación, tabla 4). A ésta concentración proteica, se necesitarían unos 7,1 L de SLC para degradar los 40 Kg de grasa, lo que podría representar el tratamiento de unos 180 Kg de RGI (asumiendo 22 % de grasa en el

residuo). Finalmente, la actividad enzimática específica promedio de los SLC, expresada en unidades por mg de proteína (150 U/mg), se encuentra entre las más altas de las ofrecidas por Sigma-Aldrich (2011-2012), para preparaciones de lipasas bacterianas (*Chromobacterium viscosum*, 2000-8000 U/mg; *Pseudomonas fluorescens*, 300 U/mg; *Pseudomonas cepacia*, 50 U/mg; *Pseudomonas* sp, 15 U/mg; *Burkholderia* sp, 12 U/mg; *Thermus flavus* y *T. thermophilus*, 3 U/g).

Los valores de actividades enzimáticas demuestran que, la población bacteriana, puede degradar este tipo de residuo, excretando al medio enzimas lipolíticas, lo cual conlleva la remoción de los componentes carbonados lipídicos que conforman el residuo.

Actualmente, se está aplicando este consorcio bacteriano en trampas de grasas localizadas en industrias procesadoras de cerdos y aves, que luego de tres meses y con aplicaciones diarias, han obtenido un porcentaje de remoción de 90% del volumen que ocupan estos residuos, además de la eliminación de olores desagradables ocasionados por los mismos. Los detalles de tales tratamientos son de naturaleza confidencial, no obstante se muestran imágenes de las trampas de grasa (Figura 2) de dos empresas que actualmente emplean este consorcio bacteriano para el biotratamiento de sus residuos grasos. Consecuentemente, estos microorganismos pueden ser potencialmente empleados no solo para aplicaciones industriales, sino también para solucionar en un gran porcentaje los problemas ambientales que estos residuos ocasionan.



**Figura 2.** Trampas de Grasa de dos empresas generadoras de residuos grasos después de tres meses de tratamiento con el consorcio bacteriano. Las imágenes a la izquierda y derecha representan la situación antes y después del biotratamiento respectivamente.

## 5. Conclusiones

Un total de 5 cepas bacterianas fueron aisladas del RGI, identificándose, mediante pruebas bioquímicas, tinción de Gram y galerías API, como perteneciente a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*. El consorcio bacteriano degradó, en 21 días de biotratamiento, 91,4 % del contenido graso del residuo; disminuyendo en un 33,6 % la DBO<sub>5,20°</sub> y un 59,8% la DQO. La actividad lipolítica de las cepas se demostró cuantitativamente (titulación potenciométrica) utilizando aceite de oliva como sustrato alcanzó valor promedio de 150 U/mg de proteínas. Aunque las cepas *Bacillus* presentaron la mayor

actividad lipolítica, no existieron diferencias notables en las actividades enzimáticas determinadas entre las cepas evaluadas. Este consorcio bacteriano puede ser empleado a nivel industrial para el biotratamiento de residuos con alto contenido lipídico.

## 6. Referencias

- Abass, O.A., Ahmad, T.J., Suleyman, A., M., Mohamed I.A., and Zahangir, A. 2011. Removal of oil and grease as emerging pollutants of concern (EPC) in wastewater stream. *IJUM Engin J.* 12(4):161-169.
- Akoh, C.C., Chang, S.W., Lee, G.C., Shaw, J.F. 2007. Enzymatic approach to biodiesel production. *J. Agric. Food Chem.* 55(22):8995-9005.
- Bailey, J.E., and Ollis, S. 1996. Applied Enzyme Catalysis. Biochemical Engineering Fundamentals. 2<sup>nd</sup> edition. Mc Graw Hill. New York. USA. 157-227p.
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P.N., Mehrotra, R. 2010. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An review. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 62(1): 9-14.
- Bhumibhamon, O., Kopraserstak, A., and Funthong, S. 2002. Biotreatment of High Fat and Oil Wastewater by Lipase Producing Microorganisms. *Kasetsart J.* 36(3): 261-267.
- Bornscheuer, U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26(1): 73-81.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid a sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2): 248-254.
- Browns, A. 2009. Benson's Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology. 11<sup>th</sup> edition. Mc Graw Hill. New York. USA. 294p.
- Cammarota, M.C.; Freire, D.M.G. 2006. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Biores. Technol.* 97(17): 2195-2210.
- Chin, S.P., Ismail, N.S., Al-Ashraf, A.A., Yahya A.R.M. 2010. Aerobic Degradation of Volatile Fatty Acids by Bacterial Strain Isolated from Rivers and Cow Farm in Malaysia. *J. Bioremed. Biodegrad.* 1(3):1-6.
- Čipinyte, V., Grigiškis, S., Baškys, E. 2009. Selection of fat-degrading microorganisms for the treatment of lipid-contaminated environment. *Biologija.* 55(3-4): 84-92.
- Cirne, D.G., Paloumet, X., Björnsson, L., Alves, M.M., Mattiasson, B. 2007. Anaerobic digestion of lipid-rich waste: Effects of lipid concentration. *Renew. Ener.* 32(6): 965-975
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. Editors. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20<sup>th</sup> Edition. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF), Washington, D.C. USA. 5-3,5-6; 5-14,5-15; 5-38 p.
- Da Silva, G.P., Mack, M., Contiero, J. 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* 27(1):30-39.
- Daniele, A., Amaíz, L., Medina, L., Valbuena, O. 2011. Actividad lipolítica de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa LN, aislada de las aguas termales Las Trincheras, Edo. Carabobo, Venezuela. *Ciencia.* 19(3):173-180.

- Di Giulio, R. 1991. Indices of oxidative stress as biomarkers for environmental contamination. Mayes, M.A y Baeon, M.B. editors. En: *Aquatic Toxicology and Risk Assesment*. American Society for Testing and Materials. Philadelphia. USA.14:15-31.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S. 2004. *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico*. 11<sup>a</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 172, 173-174p
- Gupta, R., Gupta, N., and Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64(6):763-781.
- Gunstone, F.D. 1999. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *J. Sci. Food Agric.* 79(12):1535-1549.
- Hasanuzzaman, M., Umadhay-Briones, K.M., Zsiros, S.M., Morita, N., Nodasaka, Y., Yumoto, I., Okuyama, H. 2004. Isolation, Identification and Characterization of a Novel, Oil-Degrading Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. *Curr. Microbiol.* 49(2):108-114.
- Jaeger, K. E., and Eggert, T. 2004. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr.Opin. Biotechnol.* 15(4):305-313.
- Jeganaesan, J., Bassi, A., Nakhla, G. 2006. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. *J. Hazar. Mat.*B:137. 121-128.
- Kushwaha, P., Srivastava, V., Mall, I. 2011. An Overview of Various Technologies for the Treatment of Dairy Wastewaters. *Cri. Rev. Food Sci. and Nutr.* 51(5):442- 452.
- Mac Faddin, M. 2004. *Pruebas bioquímica para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3<sup>a</sup> edición. Editorial 0200.édica Panamericana,. Buenos Aires, Argentina. 54, 73, 206, 306, 344, 411p.
- Mendes, A.A., Pereira, E.B., Castro, H.F. 2006. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion. *Biochem. Engin.* 32(3):185-190.
- Mendes, A., Pereira, E., Furigo Jr., A and Ferreira, H. 2010. Anaerobic Biodegradability of Dairy Wastewater Pretreated with Porcine Pancreas Lipase. *Braz. Arc.h Biol. Technol.* 53(6): 1279-1284.
- Mongkolthanaruk, W., and Dharmstithi, S. 2002. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *Internat. Biodeter. Biodegrad.* 50: 101-105.
- Prasad, M.P., Manjunath, K. 2011. Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. *Indian. J. Biotechnonol.* 10(1):121-124.
- Rivera-Pérez, C., and García-Carreño, F. 2007. Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. *BioTecnología.* 11(2):37-45.
- Ruggieri, L., Artola, A., Gea, T., Sánchez, A. 2008. Biodegradadion of animal fats in a co-composting process with wastewater sluge. *Internt. Biodeter. Biodegrad.* 62: 297-303.
- Saatci, Y., Arslan, E.I., Konar, V. 2001. Removal of total lipids and fatty acids from sunflower oil factory effluent by UASB reactor. *Biores. Technol.* 87(3):269-272.

- Sangeetha, R., Arulpandi, I., Geetha, A. 2011. Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview. *Res. J. Microbiol.* 6(1):1-24.
- Santos-Correa, I.N., de Sousa, S.L., Catran, M., Bernardes, O.L., Portilho, M.F., Pereira-Langone, M.A. 2011. Enzymatic biodiesel synthesis using a byproduct obtained from palm oil refining. *Enzym. Res.* 2011. ID814507:1-8.
- Sigma-Aldrich 2011-2012. Products for life science research. pp.1063-1066.
- Singh, R., Gupta, N., Goswami, V., Gupta, R. 2006. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70(6):679-682.
- Thassitou, P., Arvanitoyannis, S. 2001. Biorremediation: a novel approach to food waste management. *Trends in Food Sci. & Technol.* 12(7):185-196.
- Valencia, M. 2009. Caracterización Enzimática de cepas de *Fusarium* aisladas de lesiones de animales. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota-Colombia. 152p.