



COLEGIO

SAN AGUSTÍN

EST. 1966



MONOGRAFÍA DE BIOLOGÍA NM

Convocatoria: Noviembre 2018

Comparación de la actividad lipodegradadora de los microorganismos *Pseudomona putida* Y *Candida sp* sobre el aceite residual

¿En qué medida la actividad lipodegradadora de *Pseudomona putida* se diferencia de la *Candida sp* sobre el aceite residual, medida a través de los ácidos grasos liberados?

Código del candidato: 004727 - 0034

N.º de palabras: 3423

Supervisor: Karina Rojas

Chiclayo, Perú

AGRADECIMIENTOS

Esta monografía está dedicada antes que todo a Dios, quien me dio la inteligencia y paciencia para llevar a cabo este trabajo; a mi familia, quienes me brindaron todo el apoyo posible para que esto sea posible; y a mi asesora la miss Karina Rojas, quien estuvo presente en todo el proceso y corrección de esta.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| CAPÍTULO I: Marco Teórico | 9 |
| 1.1 Biorremediación | 9 |
| 1.1.2 Microorganismos como biodegradadores | 9 |
| 1.1.3 Proceso de biodegradación de hidrocarburos por microorganismos | 10 |
| 1.2 Bacterias..... | 10 |
| 1.2.1 <i>Pseudomona putida</i> | 11 |
| 1.3 Hongos..... | 12 |
| 1.3.1 <i>Candida sp</i> | 13 |
| 1.4 Aceite residual | 13 |
| 1.4.1 Origen..... | 13 |
| 1.4.3 Características Físico-Químicas | 14 |
| 1.4.4 Destino final | 14 |
| 1.4.7 Tratamiento | 15 |
| CAPÍTULO II: Planteamiento del problema y de la Experimentación..... | 16 |
| 2.1 Pregunta de Investigación | 16 |
| 2.2 Hipótesis..... | 16 |
| 2.3 Variables | 16 |
| 2.3.1 Variable Independiente | 16 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.2 Variable Dependiente | 16 |
| 2.3.3 Variable Controlada | 16 |
| 2.4 Materiales | 17 |
| 2.4.1 Materiales de bioseguridad | 17 |
| 2.4.2 Materiales preparación de la muestra..... | 17 |
| 2.4.3 Materiales aislamiento e incubación de microorganismos | 17 |
| 2.4.4 Materiales siembra de microorganismos en caldo contaminado | 18 |
| 2.4.5 Materiales método de titulación..... | 18 |
| 2.4.6 Equipos..... | 18 |
| 2.4.7 Medios de Cultivo..... | 18 |
| 2.5 Condiciones sobre configuración y principios éticos | 19 |
| CAPÍTULO III: Procedimiento y Métodos | 20 |
| 3.1 Preparación de las muestras | 20 |
| 3.1.1 Obtención de sustrato | 20 |
| 3.1.2 Obtención de muestras | 20 |
| 3.2 Procesamiento de muestras | 21 |
| 3.3 Aislamiento de microorganismos..... | 21 |
| 3.4 Siembra de microorganismos en caldos nutritivos | 23 |
| 3.5 Cuantificación de ácidos grasos liberados: Método de titulación..... | 24 |
| CAPÍTULO IV: Datos Obtenidos y Análisis | 25 |
| 4.1 Resultados..... | 25 |
| 4.1.1 Acción lipodegradadora de <i>Pseudomona putida</i> | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.2 Acción lipodegradadora de <i>Candida sp</i> | 25 |
| 4.1.3 Comparación de la acción lipodegradadora de <i>Pseudomona putida</i> y <i>Candida sp</i> según la liberación de ácidos grasos por día..... | 26 |
| CONCLUSIONES..... | 27 |
| MEJORA DE LA INVESTIGACIÓN | 28 |
| REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA | 29 |
| ANEXOS..... | 31 |

ÍNDICE DE TABLAS, GRÁFICOS E ILUSTRACIONES

| | |
|---|----|
| 1.1 Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>Pseudomonas putida</i> | 11 |
| 1.3 Tabla 2: Clasificación taxonómica de <i>Candida sp</i> | 12 |
| 1.5 Ilustración 1: Muestras de suelo contaminado | 19 |
| 1.6 Ilustración 2: Muestras de caldo nutritivo con suelo contaminado..... | 20 |
| 1.7 Ilustración 3: Toma de muestra de cultivo mixto..... | 21 |
| 1.8 Ilustración 4: Siembra de microorganismos en placas petri | 21 |
| 1.9 Ilustración 8: Siembra de las cepas en los tubos de ensayo | 22 |
| 1.10 Tabla 3: Liberación promedio de ácidos grasos según cepa de <i>Pseudomonas putida</i> por día..... | 24 |
| 1.11 Tabla 4: Liberación promedio de ácidos grasos según cepa de <i>Candida sp</i> por día | 24 |
| 1.12 Tabla 5: Promedio de la liberación de ácidos grasos según microorganismo biorremediador por día | 25 |
| 1.13 Gráfico 1: Actividad lipodegradadora de <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Candida sp</i> sobre los aceites residuales durante 21 días | 25 |
| 1.14 Tabla 6: Ácidos grasos liberados por cada cepa de <i>Pseudomonas putida</i> en el día 8 | 30 |
| 1.15 Tabla 7: Ácidos grasos liberados por cada cepa de <i>Candida sp</i> en el día 8..... | 30 |
| 1.16 Tabla 8: Ácidos grasos liberados por cada cepa de <i>Pseudomonas putida</i> en el día 15 | 31 |
| 1.17 Tabla 9: Ácidos grasos liberados por cada cepa de <i>Candida sp</i> en el día 15 | 30 |
| 1.19 Tabla 10: Ácidos grasos liberados por cada cepa de <i>Pseudomonas putida</i> en el día 21 | 31 |
| 1.20 Tabla 11: Ácidos grasos liberados por cada cepa de <i>Candida sp</i> en el día 21 | 32 |

INTRODUCCIÓN

Alrededor del mundo se está viviendo un grave problema, la contaminación ambiental, el avance en los distintos campos de desenvolvimiento del hombre, quien carece de una conciencia ambiental, tienen un impacto negativo en nuestro planeta lo cual perjudica la vida de los diversos organismos que lo habitan, incluido el daño que esta contaminación produce a la salud humana.

En el Perú la contaminación se vive de una manera más directa, esta se refleja en los mares, siendo el mar limeño considerado como uno de los más contaminados por los desechos que se arrojan a este, tales como basura, petróleo y aceite. Llegando a estimarse que no hay ni un solo metro de mar peruano que no esté contaminado por algún desecho, las proyecciones sugieren que para el año 2050 habrá 250 millones de desechos en el mar. Además se refleja en el aire, como consecuencia del humo procedente de fábricas; en el suelo, cuando sustancias extrañas y distintos productos químicos provocan el desequilibrio de este, afectando a las especies.

El presente trabajo se centra en la contaminación del medio ambiente por los aceites residuales, específicamente en la contaminación del agua, ya que no se disuelven y no son biodegradables. Gracias a la tecnología desarrollada hoy en día, se puede tratar esta contaminación a través de la biorremediación, donde se usan microorganismos para degradarlos.

El objetivo de esta investigación es comparar la degradación de aceite residual por parte de dos microorganismos, un hongo y una bacteria, con respecto a su actividad lipodegradadora. Lo que lleva a cuestionarme, ¿En qué medida la actividad lipodegradadora de *Pseudomona putida* se diferencia de la *Candida sp* sobre el aceite residual, medida a través de los ácidos grasos liberados? Para esto se realizará el aislamiento e incubación de los microorganismos,

para sembrarlos en cepas y posteriormente agregar al caldo nutritivo una concentración del 1% de aceite residual. La cuantificación de la degradación de este aceite se identificará con la liberación de ácidos grasos con el método de titulación de NaOH tras 8, 15 y 21 días de incubación.

Se asume que el microorganismo con mayor actividad lipodegradadora en los días de evaluación será la bacteria *Pseudomonas putida* ya que esta ha sido utilizada en anteriores trabajos de investigación obteniendo resultados óptimos debido a su capacidad degradadora.

CAPÍTULO I: Marco Teórico

1.1 Biorremediación

Se denomina biorremediación a los procesos de degradación, biodegradación o ruptura de ciertos contaminantes químicos en la que intervienen plantas o microorganismos como hongos, levaduras y bacterias, y sus enzimas, logrando generar compuestos menos agresivos para el entorno. Es un proceso de descontaminación y detoxificación de los contaminantes químicos presentes en un ambiente debido a la actividad de los seres vivos.

Esta se lleva a cabo normalmente en la naturaleza, ya sea en régimen aerobio, medio oxidante, o anaerobio, en medio reductor, en el suelo y en el agua. Se puede clasificar de dos maneras: in situ o ex situ. En la primera se trata el material contaminado en el lugar en el que se encuentra, se realiza en suelos excavados con la finalidad de degradar contaminantes de carácter orgánico como aceites. En el proceso ex situ, el material se traslada a otro lugar para realizar su descontaminación.

1.1.2 Microorganismos como biodegradadores

Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que se encuentran en la tierra, participan de manera vital en todos los ecosistemas y se encuentran en interacción continua con las plantas, animales y el hombre. Además, son la clave para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida sobre el planeta ya que participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos de los cuales dependemos no solo para sobrevivir sino para afrontar los retos que presentan el futuro. Retos tales como resolver problemas ecológicos y de contaminación ambiental.

Los microorganismos participan en procesos biotecnológicos que son esenciales para diferentes industrias como la médica; son los responsables de la descomposición de la materia

orgánica, del ciclaje de los nutrientes, y la descomposición y mineralización de desechos orgánicos.

Hoy en día un gran número de microorganismos se usan en el tratamiento de residuos de todo tipo; en la regulación de los ciclos biogeoquímicos y en la recuperación de suelo y vegetación de ecosistemas degradados.

1.1.3 Proceso de biodegradación de hidrocarburos por microorganismos

Según Steciow, M. Algunos microorganismos poseen la capacidad de utilizar hidrocarburos como una fuente de energía y carbono, llegando a degradarlos hasta dióxido de carbono y agua. Este proceso se lleva a cabo por medio de enzimas y mecanismos a nivel de membrana, que permiten la entrada de nutrientes. La utilización microbiana de hidrocarburos podría ser un método válido para la eliminación de los mismos en el ecosistema afectado. La descomposición es completa cuando estos compuestos son retornados al ambiente en forma inorgánica siendo algunos tomados por saprótrofos

Para que la degradación se lleve a cabo, es necesario que se cumplan con las condiciones ambientales adecuadas, así como la cantidad suficiente de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

1.2 Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo, entre 0,5 y 5 μm , y diferentes formas incluyendo esferas, barras y hélices. Estas son procariotas por lo que no tienen núcleo ni orgánulos internos. Son los organismos más abundantes del planeta al ser ubicuas, pudiendo encontrarse en todo hábitat de la tierra. Así mismo estas son imprescindibles para el reciclaje de los elementos.

Presentan una gran variedad de formas y tamaños, la mayoría presenta un tamaño entre 0,5 y 5 μm , sin embargo, algunas especies pueden llegar a alcanzar los 0,5 mm o 0,3 μm . En

cuanto a su forma, esta es muy variada, y muchas veces una misma especie puede adoptar distintos tipos morfológicos, a esto se le conoce como pleomorfismo. Entre las formas se distinguen tres tipos:

1.2.1 *Pseudomonas putida*

Es una de las especies de mayor interés industrial entre las bacterias del género *Pseudomonas* ya que tiene un gran potencial de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos, también presenta la capacidad de colonizar el sistema radicular de las plantas. Tiene un metabolismo aerobio estricto-oxidativo y no fermenta carbohidratos. El hábitat de esta bacteria comúnmente es el suelo y zonas acuosas, el género *Pseudomonas* se encuentra distribuido prácticamente en todas partes como el agua, suelo, gasolina, etc; esto se debe a que sus requerimientos nutricionales no son muy exigentes, por lo que crece en casi todos los medios de cultivo.

Son bacilos rectos o ligeramente curvados cortos, en pareja, también en cadenas o aislados, son Gram (-) el flagelo polar monotrico no es visible en tinción Gram ya que es muy delgado, el tamaño de las *Pseudomonas* está entre entre 0.5 μm y 0.8 μm de espesor por 1.5 μm y 3.8 μm de largo.

Tabla 1**Taxonomía de la bacteria *Pseudomonas putida***

| Nombre científico | <i>Pseudomonas putida</i> |
|--------------------------|---------------------------|
| Reino | Monera |
| Filum | Proteobacteria |
| Clase | Gammaproteobacteria |
| Orden | Pseudomonadales |
| Familia | Pseudomonadaceae |
| Género | <i>Pseudomonas</i> |
| Especie | <i>Pseudomona putida</i> |

Fuente. Microbitos Blog. (2015). Estudiando microorganismos: Pseudomonas aeruginosa, P. putida, P. fluorescens; Morfología, medios de cultivo, enfermedades y más. Recuperado de: <http://microbitosblog.com/2015/04/28/pseudomonas-aeruginosa-p-putida-p-fluorescens-morfologia-medios-de-cultivo-enfermedades-y-mas/>

1.3 Hongos

Según Paloma Cubas en Aula Botánica los hongos constituyen uno de los mayores grupos de seres vivos, son eucariotas por lo que poseen núcleo, mitocondrias, sistemas de endomembranas, entre otros rasgos típicos de las estas células. Son heterótrofos, crecen de plastidios por lo que no realizan la fotosíntesis, almacenan glucógeno en sus células como reserva. En cuanto a su hábitat, la mayoría de hongos son terrestres, pero también algunos se encuentran en hábitats acuáticos. (2007:1)

Con respecto a su uso en la biorremediación, estos pueden degradar compuestos “por medio de reacciones oxidativas catalizadas por fenoloxidasas y peroxidasas” (Curvetto,2004:14) Sus enzimas poseen un bajo grado de especificidad y las relaciones estructurales de muchos contaminantes, ha hecho que los hongos se usen o pongan a prueba para la degradación de estos.

1.3.1 *Candida sp*

Es un género de hongos unicelulares también llamados levaduras, es una de las especies más significativa por su importancia clínica, su crecimiento aparece en colonias grandes, redondas, blanco o crema.

Sus colonias son variantes, por lo general son lisas, brillantes y de color blanco o beige, sin embargo, también pueden ser plegadas, rugosas o membranosas, manteniendo el color blanco o ligeramente beige.

Tabla 2

Taxonomía Candida sp

| Nombre Científico | <i>Candida</i> |
|-------------------|-------------------|
| Reino | Fungi |
| Filum | Deuteromycota |
| Clase | Deuteromycetes |
| Familia | Cryptococcaceae |
| Género | <i>Candida</i> |
| Especie | <i>Candida sp</i> |

Fuente. Garza, E. (2012). *Caracterización taxonómica y molecular de Candida spp.* Universidad Autónoma de Nuevo León: México.

1.4 Aceite residual

1.4.1 Origen

El aceite de cocina usado (ACU) es todo aquel aceite que proviene, de una forma continua o no, de un establecimiento de todo tipo donde se vende y genera productos comestibles, en su mayoría frituras, donde a través de su uso continuo llega a sufrir un proceso térmico que cambia las características del producto original. Según la legislación europea, aceites usados son “Todos los aceites industriales con base mineral o sintética, que se hayan vuelto inadecuados para el uso que se les hubiera asignado inicialmente” (Cempre Uruguay, 2017)

1.4.3 Características Físico-Químicas

Químicamente los aceites y las grasas son lípidos simples formados por glicéridos, de acuerdo a los datos facilitados por RAFRINOR, un litro de aceite usado contiene:

- 85% de aceite
- 10% agua con restos de aceite y materia orgánica
- 5% lodos cuya composición es un 60% aceite, un 30% materia orgánica y 10% agua
- Densidad relativa de 0,91

“El consorcio de Aguas Bilbao Bizkaia recogió y analizó una muestra de aceite usado en un estanque, este se analizó y el resultado fue que la demanda química de oxígeno del aceite usado es de 3.4000.000 mgO₂/litro, y contiene aproximadamente 5.000 veces más carga contaminante que el agua residual. (Canal, Gonzáles y Ubierna, s.f: 5)

1.4.4 Destino final

En la mayoría de casos según Canal, Gonzáles y Ubierna, estos aceites residuales son liberados al medio acuático, como unas sustancias hidrofóbicas de menor densidad, como consecuencia estos compuestos aportan contaminantes a este medio tal como la elevada densidad química de oxígeno, además de afectar el intercambio gaseoso. Estas sustancias se difunden por la superficie reduciendo la oxigenación a través de la interfase aire-agua y la actividad fotosintética, porque estos absorben la radiación solar disminuyendo la producción interna de oxígeno disuelto. (s.f:5). Si estos son liberados en la tierra traerán como consecuencia el destruir el humus vegetal del suelo, convirtiéndolo en infértil, pudiendo llegar en unos años a contaminar aguas subterráneas.

1.4.7 Tratamiento

Según el Sistema de gestión de aceites Industriales en España, el aceite residual, así como todos los residuos aprovechables, para su tratamiento debe ser correctamente extraído y almacenado, para poder ser tratado a través de la regeneración, valorización energética y el reciclado. En la regeneración se elimina el agua, aditivos, metales pesados, etc, para poder obtener una base lubricante válida. En la valorización energética, un tratamiento físico-químico donde se descontamina el aceite usado, posibilitando su uso como combustible industrial. Finalmente, en el reciclado, donde se puede producir otros materiales como betún asfáltico utilizado en telas o en asfaltado de carreteras, fertilizantes, etc.

CAPÍTULO II: Planteamiento del problema y de la Experimentación

2.1 Pregunta de Investigación

¿En qué medida la actividad lipodegradadora de *Pseudomonas putida*

se diferencia de la *Candida sp* sobre el aceite residual, medida a través de los ácidos grasos liberados?

2.2 Hipótesis

La bacteria *Pseudomonas putida* presentará una mayor actividad lipodegradadora a lo largo de los días 8, 15 y 21 de evaluación; con respecto a la actividad del hongo *Candida sp*, medida a través de la cuantificación de la liberación de ácidos grasos en el aceite residual. Esto debido a la mayor capacidad degradadora de esta bacteria.

2.3 Variables

2.3.1 Variable Independiente

Especies de microorganismo biorremediador:

- *Pseudomonas putida*
- *Candida sp*

2.3.2 Variable Dependiente

- Acción lipolítica de los microorganismos medida a través de la cantidad de ácidos grasos liberados

2.3.3 Variable Controlada

- Tiempo (días de evaluación de ácidos grasos liberados)
- Cantidad de sustrato (aceite residual al 1%)
- Temperaturas de incubación entre 33 y 37°C
- pH entre 6, 7 y 8

2.4 Materiales

2.4.1 Materiales de bioseguridad

- Guardapolvo
- Guantes
- Lentes de seguridad
- Mascarilla

2.4.2 Materiales preparación de la muestra

- 500 ml de aceite residual
- Frasco de vidrio de 500 ml
- Espátula
- 1200 g de tierra contaminada con aceite residual
- 3 bolsas herméticas
- 900 ml de caldo Bushnell Haas
- 11 frascos de vidrios
- Malla filtro
- 10 g de tierra contaminada

2.4.3 Materiales aislamiento e incubación de microorganismos

- Asa bacteriológica
- Mechero
- Cultivo mixto
- Placas petri
- Agar MacConkey para aislar *Pseudomonas putida*
- Agar Plate Count para aislar *Candida sp*

2.4.4 Materiales siembra de microorganismos en caldo contaminado

- 6 frascos
- 10 ml caldo Bushnell Haas
- 30 tubos de ensayo
- Asa bacteriológica
- Aceite residual a concentración al 1%
- Algodón
- Mechero

2.4.5 Materiales método de titulación

- Fenolftaleína
- Solución de NaOH (0,05 N)
- Matraz Erlenmeyer
- Varilla agitadora

2.4.6 Equipos

- Autoclave Tuttnauer
- Balanza Electrónica Notebook
- Refrigeradora Fiocchetti

2.4.7 Medios de Cultivo

- Agar MacConkey
- Agar Plate Count
- Caldo Bushnell-haas

2.5 Condiciones sobre configuración y principios éticos

La bioseguridad es el conjunto de normas preventivas, las cuales se aplican en una situación de riesgo o como rutina en un procedimiento experimental, estas normas se implementan con el objetivo de prevenir accidentes en el laboratorio tales como la exposición a agentes con capacidad infecciosa. En la experimentación del presente trabajo se utilizó y se siguió normas de bioseguridad. Los equipos de protección personal son obligatorios para ingresar al laboratorio y manejar los microorganismos fueron: los guantes, guardapolvo, y en algunas ocasiones lentes de protección. El seguimiento de estas normas es de importancia por la higiene y seguridad en el trabajo, además de la propia salud, ya que a pesar de que los microorganismos usados no son patógenos, se sigue corriendo el riesgo de producir una reacción al tener contacto directo con ellos. Además, se ha tenido en cuenta el uso adecuado en cada uno de los equipos empleados.

CAPÍTULO III: Procedimiento y Métodos

3.1 Preparación de las muestras

3.1.1 Obtención de sustrato

Las muestras de aceite fueron recolectadas en un establecimiento de comida rápida, principalmente de frituras, ubicado en el centro de Chiclayo. Se recolectó en total una muestra de aproximadamente 500 m; la cual fue colocada en un frasco estéril de su misma cantidad cerrado herméticamente con una tapa rosca de plástico.

3.1.2 Obtención de muestras

Se tomaron muestras de suelos contaminados con aceite residual, en el centro de Chiclayo. Se limpió la superficie de la tierra a una profundidad de 1 cm, después con una espátula desinfectada se tomaron las muestras del suelo con una profundidad de 3 cm. Esta muestra fue de 1200 g de tierra, que fue dividida en tres bolsas herméticas y rotuladas con número, lugar y fecha del muestreo.



Ilustración 1

Muestras de suelo contaminado

Fuente. Elaboración propia

3.2 Procesamiento de muestras

Se coloca 90 ml de caldo Bushnell Haas en 11 frascos y se envía al autoclave. Posteriormente se tamiza la muestra con una malla de 2x2 para así separar las piedras, gramos u otros componentes, de la tierra contaminada con aceite. Se pesaron 10 g de la tierra contaminada y se agregaron en los 11 frascos de caldo Bushnell Haas. Se mezcla y se deja reposar por 14 días a una temperatura ambiente.



Ilustración 2

Muestras de caldo nutritivo con suelo contaminado

Fuente. Elaboración propia

3.3 Aislamiento de microorganismos

Al terminar los 14 días se pudo observar en la superficie de los medios de cultivo la formación de turbidez, que evidenció el crecimiento microbiano en este. Se procedió a aislar los microorganismos a través del método de agotamiento en superficie sobre medios de cultivo. Se toma el recipiente con el cultivo mixto y se agita para homogenizar su contenido, se flamea el asa bacteriológica y se toma una muestra del cultivo.

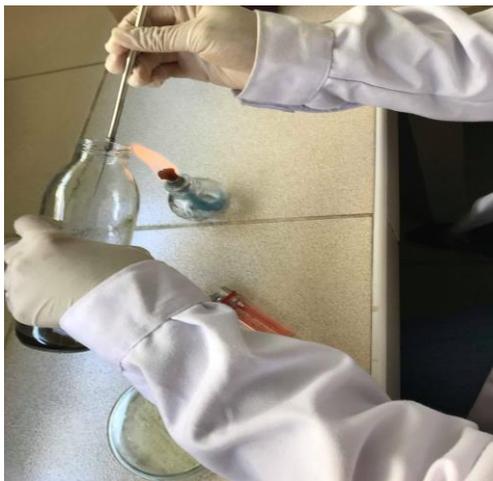


Ilustración 3

Toma de muestra del cultivo mixto

Fuente: Elaboración propia

Se procede a sembrar en una placa con Agar MacConkey, en el caso de las Pseudomonas; y en una placa de Agar Plate Count, en el caso de las candidas, para ver el crecimiento de microorganismos. Se toca con suavidad la superficie del medio y se extiende la muestra. Al destapar la placa Petri se mantiene la tapa en la mano, abriéndola lo necesario, después de sembrar se cierra la placa y se deja en posición invertida para llevar a incubar a 37°C.



Ilustración 4

Siembra de microorganismos en placas petri

Fuente. Elaboración propia

Tras 24 horas de incubación se llegan a observar las colonias formadas por los tipos de microorganismos del cultivo mixto con sus respectivas características. Los conjuntos de colonias aisladas se propagaron y sembraron en un caldo nutritivo, para luego pasarlas a sus respectivas cepas.

3.4 Siembra de microorganismos en caldos nutritivos

Posteriormente se siembra las cepas aislada en vial junto a 10 ml Bushnell Haas en tubos de ensayo, tres tubos por cada cepa de *Pseudomonas* y *Candida* y se agrega 1% del aceite residual para estimular el crecimiento. Luego se cubre cada tubo con algodón y se deja incubar por 3 semanas, evaluando la liberación de ácidos grasos en los días 8, 15, 21.



Ilustraciones 8

Siembra de las 6 cepas en los tubos de ensayo|

Fuente: elaboración propia



Ilustración 9

3.5 Cuantificación de ácidos grasos liberados: Método de titulación

Citando a Huané, L y Rivera, R. Este método se basa en medir la cantidad de ácidos grasos liberados por acción de las lipasas por titulación con NaOH en presencia de fenolftaleína. Una unidad de lipasa es la cantidad de esta requerida para liberar un μM de ácido graso por unidad de tiempo, días en este caso.

$$[\text{NaOH requeridos para titular los ácidos grasos liberados}] =$$

$$[\text{NaOH requeridos para titular la muestra}] - [\text{NaOH requeridos para titular el blanco}]$$

Entonces en nuestra titulación tenemos la siguiente ecuación:

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Donde:

N1= Normalidad de los ácidos grasos liberados en la solución (Una unidad de normalidad = 103 μM)

V1 = Volumen de reacción de la mezcla.

N2 = Normalidad de la solución de NaOH (0,05 N)

V2 = Volumen de NaOH requerido para la titulación.

A través de la fórmula se obtiene la cantidad de ácidos grasos liberados para poder calcular la actividad de lipasas por unidad de tiempo, con la siguiente fórmula:

(2014:35)

$$\text{Unidad de enzima} \left(\frac{\mu\text{M}}{\text{h}} \right) = \frac{\text{Ácidos grasos liberados} (\mu\text{M})}{\text{Tiempo de incubación} (\text{h})}$$

CAPÍTULO IV: Datos Obtenidos y Análisis

4.1 Resultados

De cada cepa se realizaron 5 repeticiones cuyos resultados figuran en Anexos como datos brutos.

4.1.1 Acción lipodegradadora de *Pseudomona putida*

Tabla 3

Liberación promedio de ácidos grasos según cepa de Pseudomona putida por día

| CEPA | LIBERACIÓN ÁCIDOS GRASOS EN μM POR DÍA | | |
|------|---|--------|--------|
| | DÍA 8 | DÍA 15 | DÍA 21 |
| A | 0,383 | 0,577 | 0,793 |
| B | 0,424 | 0,570 | 0,796 |
| C | 0,318 | 0,546 | 0,790 |

En esta tabla se evidencia el promedio de liberación de ácidos grasos por las tres cepas de *Pseudomona putida*. En el día 8, la cepa con mayor liberación fue la B con 0,424 μM ; en el día 15 la cepa con mayor liberación fue la cepa A con 0,577 μM ; mientras que en el día 21 fue la cepa B nuevamente con 0,796 μM .

4.1.2 Acción lipodegradadora de *Candida sp*

Tabla 4

Liberación promedio de ácidos grasos según cepa de Candida sp por día

| CEPA | LIBERACIÓN ÁCIDOS GRASOS EN μM POR DÍA | | |
|------|---|--------|--------|
| | DÍA 8 | DÍA 15 | DÍA 21 |
| D | 0,397 | 0,580 | 0,791 |
| E | 0,329 | 0,608 | 0,798 |
| F | 0,399 | 0,595 | 0,785 |

En esta tabla se observe la liberación de ácidos grasos por las tres cepas de *Candida sp.* En el día 8 se evidencia una mayor liberación por la cepa F con 0,399 μM ; en el día 15 la cepa con mayor liberación fue la E con 0,608 μM , en el día 21 la cepa con mayor liberación fue también la cepa F con 0,798 μM .

4.1.3 Comparación de la acción lipodegradadora de *Pseudomona putida* y

Candida sp según la liberación de ácidos grasos por día

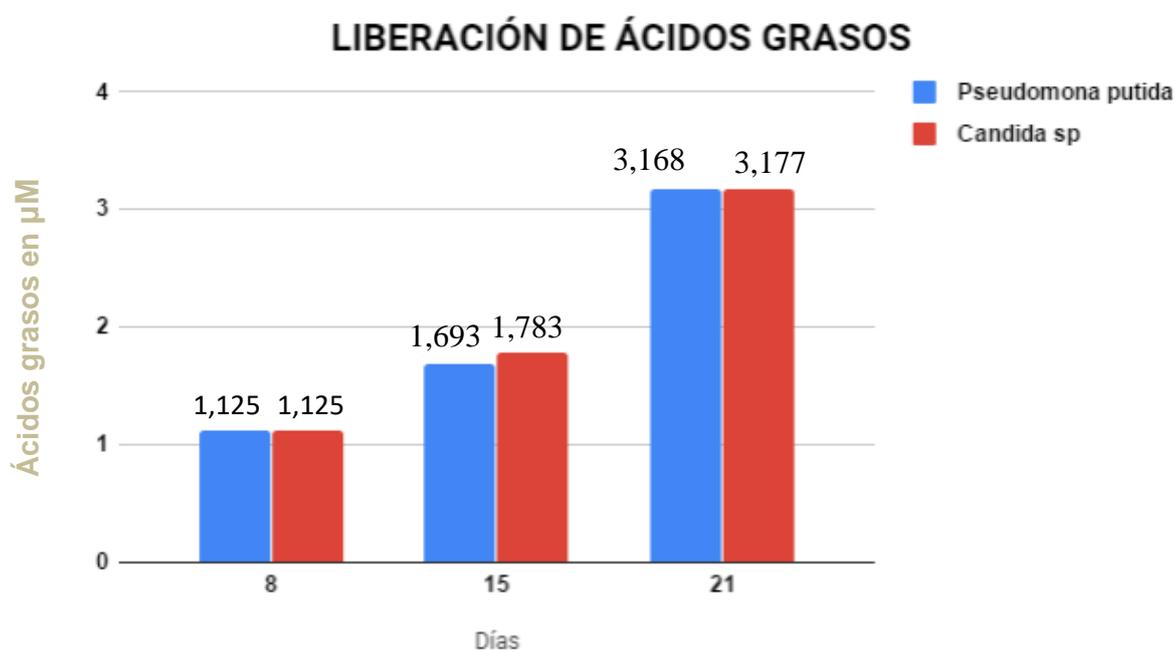
Tabla 5

Promedio de la liberación de ácidos grasos según microorganismo biorremediador por día

| Liberación de ácidos grasos en μM | | |
|--|--------------------------|-------------------|
| Días | <i>Pseudomona putida</i> | <i>Candida sp</i> |
| 8 | 1,125 | 1,125 |
| 15 | 1,693 | 1,783 |
| 21 | 3,168 | 3,177 |

Gráfico 1

Actividad lipodegradadora de *Pseudomona putida* y *Candida sp* sobre los aceites residuales durante 21 días



CONCLUSIONES

- Al realizar la comparación de la actividad lipodegradadora de ambos microorganismos, se obtuvo una diferencia nula el día 8 de medición, en el día 15 se obtuvo una diferencia de 0,09 μM , y por último en el día 21 la diferencia fue de 0.012 μM . Lo cual es mínimo, por lo que no se podría afirmar que hay una diferencia significativa entre la actividad biorremediadora sobre los aceites residuales por parte de *Pseudomonas putida* y *Candida sp.* Como se puede visualizar en la tabla 5 y el gráfico 1.
- La acción lipodegradadora se incrementa con el paso de los días para ambos microorganismos, tal como se observa en el gráfico 1.
- El día donde se evidenció más liberación de ácidos grasos y por ende, mayor degradación de aceite residual, independientemente del microorganismo usado, fue el día 21 donde la liberación de ácidos grasos por ambos microorganismos suma 6.345 μM .
- Se logró obtener la mayor cantidad de liberación de ácidos grasos, en el día 21 por parte del hongo *Candida sp.*, obteniendo un resultado de 3,177 μM . Este microorganismo tuvo una mayor adaptación al medio contaminado con aceite por lo tanto realizó una mayor actividad lipodegradadora en los tres días de evaluación, en comparación con la bacteria *Pseudomonas putida*.
- Se concluye que ambos microorganismos permiten la biodegradación de aceites residuales y si bien se observa que *Candida sp.* liberó una mayor cantidad de ácidos grasos; lo cual es contrario a mi hipótesis, esta diferencia es mínima con respecto a la cantidad de ácidos grasos liberados por *Pseudomonas putida*.

MEJORA DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación fue realizada en un periodo de 21 días en donde se evaluó la actividad lipodegradadora en los días 5, 8 y 15, obteniendo resultados óptimos aunque contrarios a lo planteado en la hipótesis, ya que el microorganismo con mayor liberación fue el hongo *Candida sp*, sin embargo esta investigación pudo obtener mejores resultados si se hubiera evaluado las muestras en un mayor tiempo y con una mayor concentración de aceite residual, en ese caso los estos hubieran sido más certeros ya que se emplearon mayor cantidad de sustrato y tiempo de evaluación.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- ✓ Ahumada, M y Gómez, R. (2009). Evaluación y selección de bacterias degradadoras de fenol por aspirimetría. Pontificia Universidad Javeriana: Colombia.
- ✓ Aula Botánica. (2007). Hongos. Aula Botánica: España.
- ✓ Canal, I; Gónzales, J. (s.f). Aceites usados de cocina, problemática ambiental, incidencias en redes de saneamiento y coste del tratamiento en depuradoras. Consorcio de Aguas Bilbao Bizkaia: Argentina.
- ✓ Curvetto, N. (2004). Biotecnología en hongos superiores. Universidad Nacional del Sur: Argentina.
- ✓ Hernández. K; Díaz, V; Torres, V; Hernández, D. (2014). Degradación de aceite residual gastado en suelo, por microorganismos nativos. Universidad autónoma de Chihuahua: Méxio
- ✓ Huané, L y Rivera, G. (2014). Evaluación de un inóculo para estimular a escala de laboratorio la biodegradación de efluentes grasos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Perú.
- ✓ Márquez, R; Navas, P; Yegres, F; Vivas, C. (2015). Biodegradación parcial de aceites residuales usados utilizando *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp*, y *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Química Viva: Argentina.
- ✓ Montoya, F. (2012). Estudio de la capacidad del suelo para la degradación de aceites comestibles usados y su incorporación como materia orgánica. Universidad de Carabobo: España.
- ✓ Otálora, J.L; Peña, M.M y Varela, A. (2000). Evaluación de la capacidad degradadora de aceite por bacterias lipolíticas en el lodo residual de la extracción de aceite en palma. Palmas: España.

- ✓ Palomino, S. (2014). Microorganismos con capacidad degradativa de aceites residuales lubricantes usados, aislados de estratos superficiales de suelos contaminados y optimización de condiciones de crecimiento. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga: Perú.
- ✓ Yépez, S. (2017). Aislamiento e identificación de microorganismos degradadores de aceite de motor usado, obtenidas de muestras de suelo de mecánicas del centro de Ibarra, en Imbabura Ecuador. Facultad de ingeniería y ciencias agropecuarias: Ecuador.

ANEXOS

Datos brutos

Liberación de ácidos grasos por día:

8.1 Día 8

Tabla 6

Ácidos grasos liberados por cada cepa de Pseudomonas putida en el día 8

| CEPA | LIBERACIÓN ÁCIDOS GRASOS EN μM POR REPETICIÓN | | | | |
|----------|--|--------|--------|--------|--------|
| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 |
| A | 0,375 | 0,438 | 0,319 | 0,354 | 0,429 |
| B | 0,485 | 0,202 | 0,473 | 0,491 | 0,470 |
| C | 0,406 | 0,379 | 0,228 | 0,213 | 0,362 |

Tabla 7

Ácidos grasos liberados por cada cepa de Candida sp en el día 8

| CEPA | LIBERACIÓN ÁCIDOS GRASOS EN μM POR REPETICIÓN | | | | |
|----------|--|--------|--------|--------|--------|
| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 |
| D | 0,383 | 0,385 | 0,354 | 0,436 | 0,427 |
| E | 0,220 | 0,367 | 0,422 | 0,217 | 0,419 |
| F | 0,406 | 0,448 | 0,371 | 0,360 | 0,412 |

8.2 Día 15

Tabla 8

Ácidos grasos liberados por cada cepa de Pseudomona putida en el día 15

| CEPA | LIBERACIÓN ÁCIDOS GRASOS EN μM POR REPETICIÓN | | | | |
|------|--|--------|--------|--------|--------|
| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 |
| A | 0,608 | 0,624 | 0,504 | 0,635 | 0,513 |
| B | 0,632 | 0,432 | 0,518 | 0,641 | 0,627 |
| C | 0,597 | 0,624 | 0,452 | 0,446 | 0,610 |

Tabla 9

Ácidos grasos liberados por cada cepa de Candida sp en el día 15

| CEPA | LIBERACIÓN ÁCIDOS GRASOS EN μM POR REPETICIÓN | | | | |
|------|--|--------|--------|--------|--------|
| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 |
| D | 0,576 | 0,554 | 0,549 | 0,604 | 0,615 |
| E | 0,471 | 0,678 | 0,685 | 0,560 | 0,647 |
| F | 0,538 | 0,683 | 0,568 | 0,549 | 0,637 |

8.3 Día 21

Tabla 10

Ácidos grasos liberados por cada cepa de Pseudomona putida en el día 21

| CEPA | LIBERACIÓN ÁCIDOS GRASOS EN μM POR REPETICIÓN | | | | |
|------|--|--------|--------|--------|--------|
| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 |
| A | 0,814 | 0,835 | 0,722 | 0,851 | 0,745 |
| B | 0,829 | 0,694 | 0,758 | 0,866 | 0,831 |
| C | 0,786 | 0,861 | 0,702 | 0,741 | 0,862 |

Tabla 11*Ácidos grasos liberados por cada cepa de Candida sp en el día 21*

| CEPA | LIBERACIÓN ÁCIDOS GRASOS EN μM POR REPETICIÓN | | | | |
|-------------|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 |
| D | 0,763 | 0,788 | 0,774 | 0,805 | 0,823 |
| E | 0,658 | 0,871 | 0,876 | 0,753 | 0,832 |
| F | 0,7673 | 0,885 | 0,730 | 0,716 | 0,826 |