

EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO BIOLÓGICO PARA LA DISMINUCIÓN
DE AZUFRE Y METALES PESADOS EN ACEITES LUBRICANTES USADOS DE
MOTOR DIÉSEL, COMO POSIBLE ALTERNATIVA PARA LA INDUSTRIA
AUTOMOTRIZ

DAVID ALEJANDRO GUTIÉRREZ MORA
JOHANA VALENTINA PÉREZ BEJARANO

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D.C.
2019

EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO BIOLÓGICO PARA LA DISMINUCIÓN DE
AZUFRE Y METALES PESADOS EN ACEITES LUBRICANTES USADOS DE
MOTOR DIÉSEL, COMO POSIBLE ALTERNATIVA PARA LA INDUSTRIA
AUTOMOTRIZ

DAVID ALEJANDRO GUTIÉRREZ MORA
JOHANA VALENTINA PÉREZ BEJARANO

Proyecto integral de grado para optar al título de
INGENIERO QUÍMICO

Directora
Adriana Inés Páez Morales
Microbióloga Industrial

Codirectora
Diana Marcela Cuesta Parra
Ingeniera ambiental

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D.C.
2019

Nota de Aceptación (Subdirector Operativo de Investigaciones)

Firma Docente Investigador

Firma Docente Jurado 1

Firma Docente Jurado 2

Bogotá, D.C., febrero de 2019.

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DÍAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA – PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Decano de la Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director General de Investigación y Proyección Social

Dr. MANUEL CANCELADO JIMÉNEZ

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. LEONARDO DE JESUS HERRERA GUTIERREZ

DEDICATORIAS

A mi madre, Sonia Rocío Mora Salazar, por el amor incondicional que siempre me ha brindado y por motivarme a soñar y cumplir todas mis metas.

A Ignacio Villanueva Bendek, por su amor y sabios consejos en los momentos difíciles. Gracias por estar todos estos años a nuestro lado.

A mi padre, Jhon Antonio Gutiérrez, por su amor y apoyo durante mi carrera profesional. Gracias por enseñarme el valor de la familia.

A toda mi familia, mis hermanos, mis abuelitos, mis amigos que estuvieron y están a mi lado, aconsejándome y mostrándome siempre el lado bonito de la vida.

A Valentina Pérez Bejarano, por ser una persona muy especial en mi vida y darle color a mi día a día, desarrollar este proyecto a tu lado me demostró que la unión hace la fuerza.

A mis maestros, quienes se esforzaron día a día por guiarme en el camino de lo correcto, me honra de sobremanera haber sido alumno de cada uno de ustedes.

A la República de Colombia, por permitirme desarrollarme como persona. Que orgullo me genera desarrollar este proyecto para el avance científico y tecnológico de Colombia.

David Alejandro Gutiérrez Mora

A Dios, por permitirme culminar esta etapa de formación profesional junto con las personas más importantes de mi vida.

A mi madre, Ana Dairen Bejarano Rozo, por ser mi compañía y aconsejarme sabiamente hasta alcanzar mis objetivos. Gracias por todo el esfuerzo que has hecho para darme siempre lo mejor.

A mi padre, Raúl Antonio Pérez Guaglianone, por su amor, motivación y apoyo incondicional durante toda mi formación. Gracias por todo el esfuerzo que has hecho para darme siempre lo mejor, eres mi modelo a seguir.

A mi hermano Manuel Alejandro Pérez Bejarano, por motivarme a ser mejor persona y profesional.

A mi familia, por creer en mis habilidades y darme ánimo durante toda mi formación.

A David Alejandro Gutiérrez Mora, por afrontar conmigo todos los retos que trajo consigo el desarrollo del proyecto, confiar en mí y motivarme a ser mejor cada día. Gracias por los momentos compartidos en el camino a ser oficialmente Ingenieros Químicos.

A mis maestros, quienes respeto mucho por su gran esfuerzo y dedicación para construir un futuro a través de los jóvenes. Gracias a cada uno de ellos por darme las herramientas necesarias para desempeñarme como Ingeniera Química e infundirme el amor por la ciencia y la ingeniería.

Johana Valentina Pérez Bejarano

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Universidad de América, por brindarnos un espacio agradable en donde adquirimos los conocimientos necesarios para nuestra formación como Ingenieros Químicos y por su compromiso con la comunidad científica.

Al grupo de investigación en energías alternativas (IENA), por generar un espacio multidisciplinar que contribuye con el desarrollo del país, en materia de nuevas tecnologías para el aprovechamiento de fuentes alternas de energía.

Al SENA - Centro de Tecnologías del Transporte (CTT), por dejarnos a cargo de este proyecto de co – investigación y financiar los recursos necesarios para el desarrollo del mismo.

A la línea de biotecnología y nanotecnología de la red tecnoparque nodo Bogotá, por apoyar este proyecto y suministrarnos los materiales, equipos, asesorías técnicas e infraestructura de laboratorios especializados requeridos.

A nuestra directora y microbióloga industrial, Adriana Inés Páez Morales, por despertar en nosotros el amor por la microbiología y brindarnos su asesoría técnica, apoyo, recursos y conocimientos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

A nuestra co – directora e Ingeniera ambiental, Diana Marcela Cuesta Parra, por su apoyo y asesoría durante todas las fases del proyecto.

Al microbiólogo Diego Fajardo Gómez, gestor en la red de tecnoparque nodo Bogotá, por acoger este proyecto y enseñarnos los fundamentos y técnicas de laboratorio necesarias para el tratamiento de los microorganismos, por su apoyo y asesoría técnica permanente.

A Daniel Alejandro Lozano, profesional en investigación del SENA – Centro de Tecnologías del Transporte, por apoyar la gestión y desarrollo experimental de todas las fases del proyecto.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	25
OBJETIVOS	27
1. GENERALIDADES	28
1.1 ACEITES LUBRICANTES UTILIZADOS EN EL SECTOR AUTOMOTOR	28
1.1.1 Composición.	29
1.2 PROPIEDADES DE LOS ACEITES LUBRICANTES UTILIZADOS EN EL SECTOR AUTOMOTOR	32
1.2.1 Viscosidad	32
1.2.2 Índice de viscosidad (IV).	33
1.2.3 Untuosidad	33
1.2.4 Punto de fluidez.	33
1.2.5 Resistencia a la oxidación	33
1.2.6 Resistencia a la corrosión	33
1.2.7 Dispersión	34
1.2.8 Detergencia	34
1.2.9 Estabilidad de la espuma	34
1.2.10 Demulsibilidad	34
1.2.11 Características de presión extrema	34
1.2.12 Estabilidad térmica	34
1.2.13 Volatilidad.	35
1.2.14 Punto de inflamación	35
1.2.15 Punto de ignición	35
1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES LUBRICANTES UTILIZADOS EN EL SECTOR AUTOMOTOR	35
1.3.1 Aceites lubricantes para motores de combustión interna	35
1.3.2 Aceites lubricantes para transmisiones	42
1.3.3 Aceites Hidráulicos.	47
1.4 PRODUCCIÓN Y CONSUMO EN COLOMBIA	49
1.4.1 Consumo de aceites lubricantes en Colombia.	50

1.4.2 Producción de aceites lubricantes.	52
1.5 ACEITES LUBRICANTES USADOS	52
1.5.2 Propiedades	53
1.5.3 Generación y recolección.	56
1.5.4 Legislación ambiental vigente	59
1.6 APROVECHAMIENTO DE ACEITES LUBRICANTES USADOS VÍA FÍSICO – QUÍMICA	63
1.6.1 Valorización energética.	63
1.6.2 Regeneración de bases lubricantes.	64
1.7 APROVECHAMIENTO DE ACEITES LUBRICANTES USADOS VÍA BIOTECNOLÓGICA	67
1.7.1 Bacterias reductoras de sulfatos	68
1.7.2 Metabolismo de las bacterias reductoras de sulfatos	70
1.7.3. Reacciones de transformación llevadas a cabo por las BRS.	73
1.7.4 Taxonomía de las bacterias reductoras de sulfatos.	75
2. MÉTODOS	78
2.1 TÉCNICAS FÍSICAS.	78
2.1.1 Filtración al vacío.	78
2.1.2 Evaporación.	78
2.1.3 Caracterización del aceite lubricante usado.	78
2.2 TÉCNICAS QUÍMICAS.	80
2.2.1 Prueba de determinación cualitativa de sulfuro de hidrógeno.	80
2.2.2 Número total ácido (TAN).	80
2.2.3 Número total básico (TBN).	80
2.3 TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	81
2.3.1 Muestreo.	81
2.3.2 Esterilización.	81
2.3.3 Siembra por extensión en superficie.	81
2.3.4 Tinción de Gram.	81
2.3.5 Aislamiento bacteriano.	82
2.3.6 Identificación molecular de bacterias.	82

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	83
3.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.	83
3.1.1 Recolección de agua termal.	83
3.1.2 Recolección de lodo termal.	83
3.2 AISLAMIENTO BACTERIANO	84
3.2.1 Aumento selectivo de la carga bacteriana	84
3.2.2 Siembra por extensión en superficie	86
3.2.3 Caracterización macroscópica	87
3.2.4 Caracterización microscópica	88
3.2.5 Selección de los microorganismos aptos para el tratamiento biológico.	89
3.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS.	92
3.4 TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE ACEITES LUBRICANTES USADOS DE MOTOR DIÉSEL	92
3.4.1 Diseño de experimentos.	93
3.4.2 Pretratamiento del aceite lubricante usado.	95
3.4.3 Tratamiento biológico de los aceites lubricantes usados.	96
3.4.4 Adecuación del aceite lubricante usado tratado biológicamente.	97
3.5 EVALUACIÓN CUALITATIVA DEL TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE LOS ALU.	98
3.5.1 Turbidez del inóculo.	98
3.5.2 Presencia de precipitado.	98
3.6 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE LOS ALU.	98
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	99
4.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.	99
4.1.1 Recolección de agua termal.	100
4.1.2 Recolección de lodo termal.	100
4.2 AISLAMIENTO BACTERIANO	101
4.2.1 Aumento selectivo de la carga bacteriana	101
4.2.2 Caracterización macroscópica	101
4.2.3 Caracterización microscópica	104
4.2.4 Selección de los microorganismos aptos para el tratamiento biológico.	106

4.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS.	109
4.3.1 Identificación molecular de la cepa B.	109
4.3.2 Identificación molecular de la cepa D.	110
4.4 TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE ACEITES LUBRICANTES USADOS DE MOTOR DIÉSEL	111
4.4.1 Pretratamiento del aceite lubricante usado.	111
4.4.2 Evaluación cualitativa.	112
4.4.3 Evaluación cuantitativa.	117
4.4.3.2 Resultados del tratamiento.	118
4.4.3.3 Análisis estadístico.	119
5. CONCLUSIONES	131
6. RECOMENDACIONES	132
BIBLIOGRAFÍA	133
ANEXOS	145

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Estructura química de los compuestos principales de un aceite lubricante.	28
Cuadro 2. Funciones del aceite lubricante en el motor de combustión interna.	29
Cuadro 3. Clasificación de las bases lubricantes según su origen.	29
Cuadro 4. Aditivos utilizados en los aceites lubricantes del sector automotor.	30
Cuadro 5. Estructura química de los aditivos antioxidantes.	32
Cuadro 6. Clasificación de los aceites lubricantes para motores de combustión interna, según la norma SAE J300.	37
Cuadro 7. Requisitos que debe cumplir un aceite monogrado de invierno.	38
Cuadro 8. Requisitos que debe cumplir un aceite monogrado de verano.	39
Cuadro 9. Sistema de clasificación API para aceites lubricantes utilizados en motores bencineros.	41
Cuadro 10. Sistema de clasificación API para aceites lubricantes utilizados en motores Diésel.	41
Cuadro 11. Clasificación de viscosidad requerida para los aceites de transmisión, según la norma SAE J306.	44
Cuadro 12. Sistema de clasificación API para aceites de transmisión manual.	45
Cuadro 13. Aceites de transmisión automática diseñados por los fabricantes de vehículos más reconocidos.	46
Cuadro 14. Características de los fluidos hidráulicos.	48
Cuadro 15. Clasificación ISO y DIN, junto con sus principales características.	48
Cuadro 16. Límite de viscosidades permisible por la norma ISO.	49
Cuadro 17. Consumo de aceite lubricante en Colombia por zonas geográficas.	51
Cuadro 18. Producción y participación en el mercado por empresa.	52
Cuadro 19. Contaminantes típicos de los aceites lubricantes usados.	53
Cuadro 20. Descripción y ubicación de las pérdidas de aceite lubricantes en el vehículo.	57
Cuadro 21. Operadores avalados por el FAU para el 2018 en Bogotá.	58
Cuadro 22. Porcentajes para mezcla y límites máximos de contaminantes en aceites usados tratados.	63
Cuadro 23. Clasificación taxonómica del género Desulfovibrio.	76
Cuadro 24. Clasificación taxonómica del género Desulfotomaculum.	77
Cuadro 25. Clasificación morfológica de las bacterias según Hans Christian Gram.	89
Cuadro 26. Proporciones de los reactivos utilizados en el tratamiento biológico de los ALU.	97

Cuadro 27. Propiedades fisicoquímicas del manantial Casablanca.	100
Cuadro 28. Caracterización macroscópica de las colonias aisladas.	101
Cuadro 29. Caracterización microscópica de las colonias aisladas.	104
Cuadro 30. Resultados de la prueba de detección cualitativa de sulfuro de hidrógeno.	106
Cuadro 31. Descripción microscópica de las cepas seleccionadas para el tratamiento biológico.	108
Cuadro 32. Descripción de los microorganismos presentes en los ALU.	111
Cuadro 33. Caracterización microscópica de las estructuras porosas formadas en los matraces de experimentación.	117
Cuadro 34. Resultados obtenidos en el tratamiento biológico de los ALU.	119
Cuadro 35. Comparación de experimentos, de manera cualitativa.	123
Cuadro 36. Parámetros de sulfatación obtenidos por el tratamiento biológico.	125

LISTA DE DIAGRAMAS

	pág.
Diagrama 1. Esquema del diseño de experimentos.	94
Diagrama 2. Plan experimental sin réplicas.	95

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Propiedades típicas de un aceite lubricante usado del sector automotor.	54
Tabla 2. Formulación del medio de cultivo utilizado durante la experimentación.	84
Tabla 3. Condiciones de incubación de las BRS en medio líquido.	86
Tabla 4. Condiciones de incubación de las colonias aisladas.	90
Tabla 5. Niveles por factor de diseño	93
Tabla 6. Nomenclatura del análisis ANOVA.	119
Tabla 7. ANOVA para la remoción de fósforo.	120
Tabla 8. ANOVA para la remoción de hierro.	120
Tabla 9. ANOVA para la remoción de Zinc.	120
Tabla 10. ANOVA para la remoción de Cobre.	121
Tabla 11. ANOVA para la remoción de Silicio.	121
Tabla 12. ANOVA para la remoción de Sodio.	121
Tabla 13. ANOVA para la remoción de Aluminio.	122
Tabla 14. ANOVA para la remoción de Molibdeno.	122
Tabla 15. ANOVA para la remoción de Calcio.	122
Tabla 16. ANOVA para la remoción de Magnesio.	122
Tabla 17. Elementos presentes en el medio de cultivo Postgate C.	124
Tabla 18. Parámetros de la NTC-5995.	125

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Consumo de aceite lubricante desde el año 1996.	50
Gráfica 2. Mercado de aceite lubricante en Colombia por sectores.	51
Gráfica 3. Generación de aceite lubricante usado entre el año 2010 y 2016.	58
Gráfica 4. Recolección y aprovechamiento de ALU entre el año 2010 y 2016.	59
Gráfica 5. Formación de precipitado en el tratamiento biológico de los ALU con la cepa B.	113
Gráfica 6. Turbidez de los inóculos en el tratamiento biológico de los ALU con la cepa B.	114
Gráfica 7. Formación de precipitado en el tratamiento biológico de los ALU con la cepa D.	115
Gráfica 8. Turbidez de los inóculos en el tratamiento biológico de los ALU con la cepa D.	116
Gráfica 9. Resultados de la espectrometría de infrarrojo para la cepa B.	126
Gráfica 10. Comparación de la norma NTC 5995 con los resultados del experimento 50% inóculo-50% ALU.	127
Gráfica 11. Resultados de la espectrometría infrarrojo para la cepa D.	127
Gráfica 12. Comparación de la norma NTC 5995 con los resultados de 75% inóculo-25% ALU.	128
Gráfica 13. Variación de molibdeno, calcio, magnesio, zinc y sodio en experimentos al 50% inóculo-50% ALU.	129
Gráfica 14. Variación de molibdeno, calcio, magnesio, zinc y sodio en experimentos al 75% inóculo-25% ALU.	129

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Rangos de temperatura ambiente en que los aceites monogrado y multigrado satisfacen los requerimientos de la norma SAE J300.	40
Figura 2. Sistema de transmisión de movimiento de un vehículo.	43
Figura 3. Concentración molar de S, O y N de ALU y lubricante nuevo.	55
Figura 4. Ciclo de oxidación de los aceites lubricantes.	56
Figura 5. Acoplamiento entre los procesos de síntesis de ATP y reducción disimilativa de sulfatos.	73
Figura 6. Longitudes de onda esperadas para parámetros de desgaste en los ALU.	79
Figura 7. Localización del mesotermal Casablanca.	99

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Descripción general del proceso de reducción disimilativa de sulfatos.	70
Ecuación 2. Proceso de activación de sulfatos en el citoplasma de las BRS.	71
Ecuación 3. Reducción de la coenzima FAD.	71
Ecuación 4. Reducción de APS a AMP.	71
Ecuación 5. Disociación del aducto de sulfito.	71
Ecuación 6. Mecanismo de la reducción directa de sulfitos.	72
Ecuación 7. Reducción del ion bisulfito a tritionato.	72
Ecuación 8. Reducción de tritionato a ion tiosulfato.	72
Ecuación 9. Reducción del ion tiosulfato a sulfuro.	72
Ecuación 10. Generación de sulfuro de hidrógeno.	74
Ecuación 11. Formación de sulfuros metálicos.	74
Ecuación 12. Fundamento de la prueba de detección cualitativa de sulfuro de hidrógeno.	80
Ecuación 13. Formula de obtención del porcentaje de remoción.	119

LISTA DE IMÁGENES

	pág.
Imagen 1. Enriquecimiento de la muestra de lodo termal.	86
Imagen 2. Siembra por extensión en superficie de las muestras de agua y lodo termal enriquecidas.	87
Imagen 3. Montaje de la prueba de detección cualitativa de ácido sulfhídrico.	91
Imagen 4. Montaje para la filtración al vacío de las muestras de ALU.	96
Imagen 5. Montaje del tratamiento biológico de los aceites lubricantes usados.	97
Imagen 6. Sitios del mesotermal “Casablanca” seleccionados para el muestreo.	100
Imagen 7. Experimento del potencial negativo Eh.	109
Imagen 8. Precipitado obtenido en los experimentos llevados a cabo con la cepa B, una vez transcurrido el tiempo de experimentación.	113
Imagen 9. Precipitado obtenido en los experimentos llevados a cabo con la cepa D, una vez transcurrido el tiempo de experimentación.	115

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Procedimiento para la preparación del medio de cultivo Postgate C.	146
Anexo B. Procedimiento para la solidificación del medio de cultivo Postgate C.	147
Anexo C. Procedimiento de siembra por extensión en superficie e incubación bacteriana anaerobia.	148
Anexo D. Procedimiento para la coloración de Gram.	149
Anexo E. Procedimiento para la prueba de detección cualitativa de sulfuro de hidrógeno.	150
Anexo F. Instrumentos de laboratorio utilizados durante la experimentación.	151
Anexo G. Equipos utilizados durante la experimentación.	155
Anexo H. Reactivos utilizados durante la experimentación.	158
Anexo I. Caracterización fisicoquímica inicial del ALU.	159
Anexo J. Caracterización fisicoquímica del ALU tratado por medio del experimento al 50% con la cepa B.	160
Anexo K. Caracterización fisicoquímica del ALU tratado por medio de la réplica del experimento al 50% con la cepa B.	161
Anexo L. Caracterización fisicoquímica del ALU tratado por medio del experimento al 75% con la cepa B.	162
Anexo M. Caracterización fisicoquímica del ALU tratado por medio de la réplica del experimento al 75% con la cepa B.	163
Anexo N. Caracterización fisicoquímica del ALU tratado por medio del experimento al 50% con la cepa D.	164
Anexo O. Caracterización fisicoquímica del ALU tratado por medio de la réplica del experimento al 50% con la cepa D.	165
Anexo P. Caracterización fisicoquímica del ALU tratado por medio del experimento al 75% con la cepa D.	166
Anexo Q. Caracterización fisicoquímica del ALU tratado por medio de la réplica del experimento al 75% con la cepa D.	167
Anexo R. Secuencia ensamblada.	168
Anexo S. Resultado de la comparación de secuencias 16S de la cepa B contra la base de datos RDP, utilizando la herramienta Classifier.	169
Anexo T. Resultado de la comparación de secuencias 16S de la cepa B, contra SeqMatch-RDP.	170
Anexo U. Árbol filogenético de la cepa B.	171
Anexo V. Secuenciación del gen ribosomal 16S de la cepa D.	172

ABREVIATURAS

ALU: Aceite Lubricante Usado de motor Diésel.

ANOVA: Análisis de Varianza.

API: *American Petroleum Institute* – Instituto Americano del Petróleo.

ASTM: *American Society for Testing and Materials* - Sociedad Americana para Ensayos y Materiales.

BPDC: Barriles Producidos por Día Calendario.

BRS: Bacterias Reductoras de Sulfatos.

cP: Centipoise.

cSt: Centistoke.

CTT: Centro de Tecnologías del Transporte.

DAMA: Departamento Administrativo del Medio Ambiente.

Eh: Potencial de óxido – reducción.

ISO: *International Organization for Standardization* – Organización Internacional de Normalización.

MÁX: Máxima.

NTC: Norma Técnica Colombiana.

rpm: revoluciones por minuto.

RDP: Sitio web *Ribosomal Data Project*.

RUNT: Registro Único Nacional de Transito.

SAE: *Society of Automotive Engineers* – Sociedad de Ingenieros Automotrices.

SENA: Servicio Nacional de Aprendizaje.

GLOSARIO

ACEITE LUBRICANTE USADO: todo aceite de motor o de transmisión, que como consecuencia de su uso perdió las propiedades de diseño.

ANAEROBIOSIS: condición de ausencia de oxígeno requerida para el metabolismo de las bacterias reductoras de sulfatos.

AISLAMIENTO BACTERIANO: separación de una colonia bacteriana presente en un cultivo mixto de microorganismos.

APROVECHAMIENTO: recuperación del “valor remanente o el poder calorífico”¹ de los aceites lubricantes usados, por medio de métodos físicos, químicos o biológicos.

BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATOS: grupo de “bacterias que utilizan los sulfatos, tiosulfatos, sulfuros y/o nitratos del medio”², para llevar a cabo sus procesos metabólicos.

BIOPELÍCULA: población bacteriana adherida irreversiblemente a una superficie porosa.

CEPA BACTERIANA: conjunto de bacterias clasificadas taxonómicamente con el mismo género y especie.

COLONIA BACTERIANA: agrupación de bacterias de la misma cepa sobre un medio de cultivo solidificado.

FILOGENIA: “relación de parentesco entre especies o taxones”³.

INÓCULO: suspensión bacteriana utilizada en el tratamiento biológico de los aceites lubricantes usados de motor Diésel.

MEDIO DE CULTIVO: solución acuosa compuesta por macro elementos, micronutrientes y factores de crecimiento requeridos por las bacterias para su metabolismo.

¹ COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Decreto 4741 (30, diciembre, 2005). Por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y el manejo de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral [en línea]. Bogotá D.C.: El ministerio, 2005. p. 3. Disponible en Internet: <https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=18718>

² D. Thierry and W. Sand. Microbial influenced corrosion. Nueva York, 2002. p. 812.

³ López Martínez, N y Truyols Santoja, J. Paleontología: Conceptos y métodos. España: síntesis, 1994. p. 334. ISBN: 84-7738-249-2.

METABOLISMO: serie de reacciones bioquímicas llevadas a cabo por las bacterias, con el fin de sintetizar la energía requerida para su regeneración estructural y duplicación.

METABOLITOS: sustancias químicas producidas por las bacterias como consecuencia del metabolismo de la fuente nutricional.

METALES PESADOS: principal contaminante de los aceites usados provenientes del sector automotor. Son un grupo de elementos químicos “cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua; destacándose el cromo (Cr), cobre (Cu), níquel (Ni), plomo (Pb), estaño (Sn) y zinc (Zn)”⁴.

⁴ FERGUSSON, Jack E. The heavy elements: Chemistry, Environmental impact, and health effects. 1 ed. Oxford, England: Pergamon Press, 1990.

RESUMEN

Los aceites lubricantes usados de motor Diésel (ALU) presentan concentraciones de fósforo, silicio, hierro, calcio, magnesio, zinc, sodio y agua, que provienen principalmente de la oxidación y desgaste de las piezas metálicas del motor, de la combustión incompleta y de la degradación de aditivos⁵. La liberación ilegal de los ALU al ambiente ocasiona un impacto ambiental significativo sobre los recursos hídricos, suelos y aire. La presente investigación se enfocó en proponer y evaluar un tratamiento biológico a nivel de laboratorio, que permitiera remover el azufre y los metales pesados presentes en los ALU generados por el SENA – Centro de Tecnologías del Transporte, utilizando bacterias reductoras de sulfatos (BRS). La evaluación cualitativa y cuantitativa de la remoción de azufre y metales pesados se realizó durante 29 días, encontrando que las cepas nativas de BRS son aptas para el propósito planteado, gracias a que llevan a cabo la ruta metabólica de reducción disimilativa de sulfatos. El tratamiento biológico propuesto alcanzó porcentajes de remoción promedio superiores a 70% en los contaminantes hierro, silicio, aluminio y cobre; además, removió en su totalidad los compuestos de azufre presentes en la matriz del ALU.

Palabras clave: Aceites Lubricantes Usados; Azufre; Bacterias Reductoras de Sulfatos; Metales pesados; Remoción.

⁵ TORMOS, Bernardo. Diagnóstico de motores Diésel mediante el análisis de aceite usado [en línea]. España: editorial reverté, S.A, 2005. p. 38. ISBN 84-291-4702-0. Disponible en Internet: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=DqJuqL_UzjkC&oi=fnd&pg=PA1&dq=aceites+lubricantes+usado&ots=kHaEfggCo_&sig=WDqhKMwEJdc14oCp2HoNIRiC2yM#v=onepage&q&f=false.

INTRODUCCIÓN

Según la Ley 253 del año 1996⁶, los aceites lubricantes usados se consideran un residuo peligroso que debe controlarse, debido a la alta concentración de contaminantes tóxicos que lo componen: azufre, metales pesados, compuestos organometálicos, solventes clorados, entre otros; que si por cualquier motivo son liberados al ambiente sin un tratamiento adecuado, contaminan significativamente las fuentes hídricas, aire y suelos. Por otra parte, la calidad de vida de las personas que entran en contacto con dicho residuo o sus subproductos se ve afectada, pues al someter este mismo a procesos de combustión, se emiten compuestos de azufre (SO_x), compuestos de nitrógeno (NO_x), metales pesados y material particulado, en concentraciones altamente tóxicas para el ser humano.

En el año 2016, se generaron aproximadamente “531,794 barriles de aceite lubricante usado”⁷ provenientes principalmente del sector automotor de carga. Según la Asociación Colombiana del Petróleo⁸, el 71% de dichos aceites fue dispuesto o aprovechado correctamente, sin embargo, el 29% restante no fue registrado, es decir que pudo ser utilizado sin tratamiento alguno como “combustible, desmoldante de piezas de ladrillo”⁹, en ventas ilegales o vertido al ambiente. A pesar del esfuerzo del gobierno nacional y del sector privado, las cifras de aceite lubricante usado reintegrado al mercado son alarmantes: el fondo de aceites usados estima que “entre el 15 y el 20% del mercado de aceite lubricante es falsificado”¹⁰.

La precipitación de sulfuros metálicos en tratamientos hidrometalúrgicos y de aguas de drenajes ácidos de mina, ha sido ampliamente estudiada bajo un enfoque biotecnológico utilizando bacterias reductoras de sulfatos (BRS). En estos estudios, se concluye que los tratamientos biológicos traen consigo beneficios ambientales significativos, respecto a los tratamientos fisicoquímicos utilizados para el mismo fin¹¹. La presente investigación está enfocada en extraer el mecanismo

⁶COLOMBIA. CONGRESO DE LA REPÚBLICA. Ley 253 (17, enero,1996). Por medio de la cual se aprueba el convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación [en línea]. Diario oficial. Bogotá, D.C., 1996. no. 42.688. Disponible en Internet: http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/leyes/1996/ley_0253_1996.pdf

⁷ ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE PETROLEO. [En línea]. Informe estadístico petrolero. Bogotá. 2017.

⁸ ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE PETROLEO. Fondo de Aceites Usados. Panorama general del aceite lubricante usado. [Diapositivas]. Bogotá. 2017. Diapositiva 10.

⁹ MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Manual técnico para el manejo de Aceites Lubricantes Usados de origen automotor e industrial. [en línea]. 2 ed. Bogotá (Colombia), 2014. p.18. ISBN: 978-958-8491-87-5. Disponible en Internet:

<https://acp.com.co/web2017/images/pdf/combustiblesylubricantes/FAU/Manual-AU-final-14.pdf>.

¹⁰ ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE PETROLEO. Fondo de Aceites Usados. Ilícito de lubricantes. Bogotá. [En línea]. Junio de 2018. Disponible en Internet: <https://acp.com.co/web2017/es/lubricantes/117-ilicito-de-lubricantes>.

¹¹ LEWIS Alison. Review of metal sulphide precipitation [en línea]. Prospectiva, vol. 104, p. 222-234. Disponible en internet: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304386X10001775>.

biotecnológico utilizado en los tratamientos descritos anteriormente y evaluar un tratamiento biológico a nivel de laboratorio con cepas nativas de BRS, que permita remover el azufre y los metales pesados presentes en los aceites lubricantes usados de motor Diésel (ALU) generados por el SENA – Centro de Tecnologías del Transporte (CTT), una entidad de formación técnica y tecnológica en el sector de la mecánica automotriz, que actualmente genera 4.5 galones mensuales de ALU como resultado de sus actividades.

Este proyecto de investigación fue apoyado por la Fundación Universidad de América (FUA), el Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA) y el Centro de Tecnologías del Transporte (CTT). Se compone de tres fases que tienen como objetivo la purificación de la base lubricante de los ALU generados por el CTT y la evaluación de la reincorporación de dicho residuo a su cadena de procesos. La fase inicial comprende la evaluación de los procesos de pre – tratamiento requeridos para el tratamiento biológico de los ALU, seguida por el tratamiento biológico de los mismos para la remoción de azufre y metales pesados, y la fase final que consiste en llevar a cabo pruebas mecánicas en un dinamómetro de potencia, utilizando el ALU tratado biológicamente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la disminución de azufre y metales pesados en aceites lubricantes usados de motor diésel, a partir del tratamiento microbiológico; para su posible reutilización en la industria automotriz.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar los microorganismos encargados de disminuir el azufre y los metales pesados, en los aceites lubricantes usados de motor Diésel; a partir de un muestreo de agua y lodo termales.
- Evaluar de manera cualitativa la remoción de azufre y metales pesados en los aceites lubricantes usados de motor Diésel, por parte de los microorganismos seleccionados.
- Evaluar de manera cuantitativa, bajo condiciones controladas, la remoción de azufre y metales pesados en el aceite lubricante residual.
- Plantear bajo las características del aceite usado tratado, posibles usos en la industria automotriz.

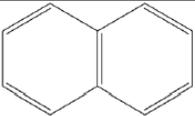
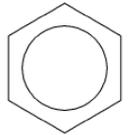
1. GENERALIDADES

En este capítulo se presentarán los elementos necesarios para contextualizar al lector en lo referente a los aceites lubricantes utilizados actualmente en el sector automotor. Se describirá desde su composición, hasta los diferentes tratamientos que pueden realizársele a estos una vez han finalizado su vida útil y adquieren las propiedades de residuo peligroso. Al terminar este capítulo, el lector comprenderá la utilidad que tiene el aprovechamiento de dicho residuo en la industria automotriz y la importancia de plantear alternativas ambientalmente amigables para su tratamiento.

1.1 ACEITES LUBRICANTES UTILIZADOS EN EL SECTOR AUTOMOTOR

La mayoría de los aceites lubricantes utilizados en el sector automotor son “subproductos líquidos de la destilación del petróleo”¹², “contienen entre 45 - 76% de parafina, 13 - 45% de naftenos y 10 - 30% de compuestos aromáticos”¹³. En el **cuadro 1**, se presenta la estructura química de los compuestos principales de un aceite lubricante.

Cuadro 1. Estructura química de los compuestos principales de un aceite lubricante.

Componente	Estructura química
Parafina	C_nH_{2n+2}
Naftenos	
Aromáticos	

Fuente. GÓMEZ ESTRADA, Yesid Antonio. Contribución al desarrollo y mejora para la cuantificación de la degradación en aceites lubricantes usados de MCIA a través de la técnica de espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Tesis para optar por el título de PhD en sistemas de medio de transporte. Valencia, 2013, Universidad Politécnica de Valencia. p. 48.

Según Lubricantes Gulf¹⁴, dichos aceites cumplen la función de reducir el rozamiento entre piezas, refrigerar, eliminar impurezas, transmitir energía y evitar la corrosión y desgaste. En el **cuadro 2**, se describen las funciones del aceite lubricante en el motor de combustión interna.

¹² MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE, Op. cit., p.14.

¹³ MARTÍN PANTOJA, José Luis. La gestión de los aceites usados [en línea]. Madrid (España): Escuela de Organización Industrial, 2008, p.14. Disponible en Internet: www.eoi.es/es/file/18223/download?token=mqjpBqGp.

¹⁴ LUBRICANTES GULF. Manual técnico [en línea]. Buenos Aires (Argentina): p. 7 Disponible en Internet: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:aAOeXr_oBUUJ:remex.com.ar/descargas_web/1-1%2520Gulf%2520-%2520Manual%2520Tecnico%2520de%2520Lubricantes.pdf+%cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=co

Cuadro 2. Funciones del aceite lubricante en el motor de combustión interna.

Función	Descripción
Refrigeración	Contribuye a mantener el equilibrio térmico en el motor, disipando el calor producido como consecuencia de frotamientos, combustión, entre otros.
Eliminación de impurezas	Mantiene suspendidas y elimina a través del filtro las impurezas provenientes de la combustión, del desgaste o corrosión y de la contaminación exterior.
Anticorrosivo y antidesgaste	El aceite lubricante contiene aditivos específicos para preservar de la corrosión a los metales y aleaciones que conforman las piezas del motor.
Sellante	Se acumula en aquellas zonas donde se presentan fugas de gases, las cuales reducen el rendimiento del motor.
Transmisor de energía	Al ser un fluido hidráulico transmite energía de un punto a otro del sistema.

Fuente. LUBRICANTES GULF. Manual técnico [en línea]. Buenos Aires (Argentina): 3 p. Disponible en Internet: http://remex.com.ar/descargas_web/1-1%20Gulf%20Manual%20Tecnico%20de%20Lubricantes.pdf.

1.1.1 Composición. Los aceites lubricantes utilizados en el sector automotor están compuestos por “una base que provee las características lubricantes primarias y aditivos que aumentan su rendimiento, eficiencia y vida útil”¹⁵.

1.1.1.1 Base lubricante. Proporciona al aceite lubricante las características primarias de lubricación¹⁶. Se clasifican según su origen, tal como se presenta en el **cuadro 3**.

Cuadro 3. Clasificación de las bases lubricantes según su origen.

Base lubricante	Características
Bases minerales	Son subproductos líquidos de la refinación del crudo de petróleo. “Por su alto índice de viscosidad, el crudo parafínico es el más utilizado en la fabricación de bases lubricantes” ¹⁷ .

¹⁵ MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE, Op. cit., p.6.

¹⁶ AGUDELO LÓPEZ, Sebastián y HERNÁNDEZ BAENA, Diego Andrés. Sistema de recolección de aceites residuales para estaciones de servicio y servitecas, contribuyendo con el cuidado y la preservación del medio ambiente [en línea]. Trabajo de grado para optar por el título de ingeniero mecánico. Medellín. Universidad EAFIT. Área de proyectos, 2006. p. 20. Disponible en Internet: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/021246/021246.htm>

¹⁷ ORTIZ MEDINA, Oscar Leonardo. Evaluación de la gestión integral del manejo de aceite usado vehicular en Bogotá [en línea]. Trabajo de grado para optar por el título de máster en gestión ambiental. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de estudios ambientales y rurales. Bogotá, 2007. p.13. Disponible en Internet:

Cuadro 3. (Continuación).

Base lubricante	Características
Bases sintéticas	“Fabricadas mediante procesos de síntesis química” ¹⁸ . Aportan al aceite final “mayor índice de viscosidad, mayor punto de fluidez a bajas temperaturas, mayor estabilidad térmica y a la oxidación y menores volatilidades que las bases minerales” ¹⁹ .
Bases semi – sintéticas	Son mezclas en diferentes proporciones de base mineral con base sintética, dicha mezcla “conserva las propiedades de ambas bases” ²⁰ .

Fuente. Elaboración propia basada en fuentes bibliográficas.

1.1.1.2 Aditivos. Son compuestos químicos solubles en la base lubricante, se adicionan a esta “entre un 15% - 25% en volumen, con el fin de mejorar las propiedades de protección de las superficies metálicas, la resistencia térmica y a la oxidación y en general prolongar la vida útil del aceite”²¹. Los aceites lubricantes “pueden contener uno o varios tipos de aditivos dependiendo del diseño de la máquina y sus condiciones de funcionamiento”²². En el **cuadro 4**, se presenta la clasificación de los aditivos utilizados en los aceites lubricantes del sector automotor, su composición y razones de uso.

Cuadro 4. Aditivos utilizados en los aceites lubricantes del sector automotor.

Clasificación	Composición	Razones de uso
Antioxidantes o inhibidores de oxidación	Compuestos orgánicos que contienen azufre, fósforo o nitrógeno, tales como aminos orgánicos, sulfuros, hidroxisulfuros y fenoles. Con frecuencia se incorporan metales como estaño, zinc o bario.	Evitan las acumulaciones de barniz y cienos sobre las partes del motor. Evitan la corrosión de cojinetes aleados.

observatorio ambiental de Bogotá. <http://oab.ambientebogota.gov.co/es/con-la-comunidad/ES/evaluacion-de-la-gestion-integral-del-manejo-de-aceite-usado-vehicular-en-bogota-br>

¹⁸ MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE, Op. cit., p.14.

¹⁹ LUBRICANTES GULF, Op. Cit., p.7.

²⁰ *Ibíd.*, p.7.

²¹ MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE, Op. cit., p.14.

²² TEXACO INC. Operación de motores Diésel, de dos combustibles y de gas. Edición, Barcelona. España. 1960. p 32. Citado por: AGUDELO LÓPEZ, Sebastián y HERNÁNDEZ BAENA, Diego Andrés. Sistema de recolección de aceites residuales para estaciones de servicio y servitecas, contribuyendo con el cuidado y la preservación del medio ambiente [en línea]. Trabajo de grado para optar por el título de ingeniero mecánico. Medellín. Universidad EAFIT. Área de proyectos, 2006. Disponible en Internet: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/021246/021246.htm>

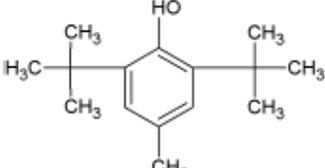
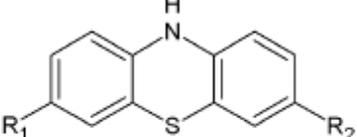
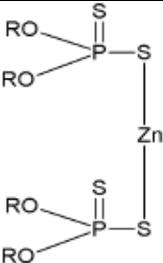
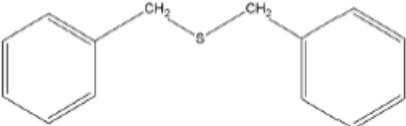
Cuadro 4. (continuación).

Clasificación	Composición	Razones de uso
Anticorrosivos, preventivos de corrosión o anti catalíticos	Compuestos orgánicos que contienen azufre activo, fósforo o nitrógeno, tales como sulfuros orgánicos, fosfitos, sales metálicas de ácido tiofosfórico o ceras sulfuradas.	Evitan el fallo en los cojinetes aleados por la acción corrosiva. Evitan el ataque corrosivo en otras superficies metálicas.
Detergentes	Compuestos metalo – orgánicos como fosfatos, fenolatos o alcoholatos. Jabones de alto peso molecular que contienen metales como el magnesio, bario o estaño.	Mantienen limpias las superficies y evitan los depósitos de cienos.
Dispersantes	Compuestos metalo – orgánicos como naftenatos o sulfonatos. Sales orgánicas que contienen metales como calcio, cobalto o estroncio.	Mantienen los cienos solubles evitando que se depositen en las partes del motor.
Agentes de presión extrema	Compuestos fosforados como el fosfato tricresil o compuestos halogenados; Jabones de plomo.	Evitan el desgaste innecesario de las partes móviles: rayado o escoriado.
Preventivos del moho	Aminos y ciertos ácidos grasos o derivados halogenados de ciertos ácidos grasos sulfonados.	Evitan la herrumbre en los motores nuevos y reparados durante su almacenamiento o embarque.
Depresores del punto de congelación	Productos de condensación de alto peso molecular, tales como fenoles condensados con cera clorinada; Polímeros de metacrilato.	Disminuyen el punto de fluidez de los aceites lubricantes.
Mejoradores del índice de viscosidad	Olefinas polimerizadas o iso – olefinas. Butilpolimeros, esterres de celulosa, caucho hidrogenado.	Disminuyen la razón de cambio de la viscosidad con la temperatura.
Inhibidores de espuma	Siliconas	Evitan la formación de espuma estable.

Fuente. TEXACO INC. Operación de motores Diésel, de dos combustibles y de gas. Edición, Barcelona. España. 1960. p 32. Citado por: AGUDELO LÓPEZ, Sebastián y HERNÁNDEZ BAENA, Diego Andrés. Sistema de recolección de aceites residuales para estaciones de servicio y servitecas, contribuyendo con el cuidado y la preservación del medio ambiente [en línea]. Trabajo de grado para optar por el título de ingeniero mecánico. Medellín. Universidad EAFIT. Área de proyectos, 2006. Disponible en Internet: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/021246/021246.htm>.

Algunos aditivos como los antioxidantes, se desnaturalizan debido a las condiciones de trabajo del motor y pueden llegar a ser los causantes del aumento de la concentración de metales pesados, azufre, nitrógeno y oxígeno en el aceite lubricante. En el **cuadro 5**, se presentan algunos de los aditivos antioxidantes más utilizados en la industria.

Cuadro 5. Estructura química de los aditivos antioxidantes.

Aditivo	Estructura química
2,6 diterbutil para cresol	
Feontiazina	
Ditiofosfato de Zinc	
Difenil-sulfito	

Fuente. GÓMEZ ESTRADA, Yesid Antonio. Contribución al desarrollo y mejora para la cuantificación de la degradación en aceites lubricantes usados de MCIA a través de la técnica de espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Tesis para optar por el título de PhD en sistemas de medio de transporte. Valencia, 2013, Universidad Politécnica de Valencia. p. 32-35.

1.2 PROPIEDADES DE LOS ACEITES LUBRICANTES UTILIZADOS EN EL SECTOR AUTOMOTOR

Para que un aceite lubricante pueda desempeñar todas sus funciones a lo largo de su vida útil y satisfacer las especificaciones requeridas por las organizaciones de estandarización, es necesario verificar el cumplimiento de un conjunto de propiedades muy específicas para estos aceites.

1.2.1 Viscosidad. Se define como la resistencia del aceite lubricante a fluir bajo la acción de una fuerza externa y es la propiedad más importante a tener en cuenta

para garantizar una buena lubricación de las piezas del motor. “La viscosidad varía inversamente con la temperatura”²³ y “directamente con la presión”²⁴.

1.2.2 Índice de viscosidad (IV). Es la “relación que existe entre la viscosidad y la temperatura del aceite lubricante”²⁵; los aceites con IV alto presentarán menos cambios en la viscosidad a altas temperaturas. Por naturaleza, los aceites lubricantes provenientes de la refinación del crudo parafínico poseen un IV más elevado que los derivados del crudo nafténico. El IV “puede aumentarse incorporando aditivos clasificados como mejoradores del índice de viscosidad”²⁶.

1.2.3 Untuosidad. Se refiere a la capacidad de un aceite lubricante para “adherirse a las superficies, manteniendo entre estas una lubricación constante”²⁷.

1.2.4 Punto de fluidez. Corresponde a la “temperatura más baja a la que un aceite lubricante puede fluir, bajo condiciones de prueba”²⁸; ésta propiedad “determinará si el aceite es aceptable para su funcionamiento en ambientes fríos”²⁹. El punto de fluidez puede reducirse incorporando aditivos clasificados como depresores del punto de fluidez.

1.2.5 Resistencia a la oxidación. Se refiere a la capacidad de un aceite lubricante para resistir las condiciones oxidantes que se presentan dentro del motor; “las altas temperaturas en presencia de oxígeno, ocasionan en el aceite lubricante la formación de productos de oxidación perjudiciales para el motor”³⁰. La resistencia a la oxidación puede mejorarse incorporando aditivos clasificados como antioxidantes.

1.2.6 Resistencia a la corrosión. Se refiere a la capacidad de un aceite lubricante para impedir la oxidación de las piezas metálicas del motor, bajo las condiciones de operación del mismo; actualmente, “las pruebas de corrosión de MacCoull son las más utilizadas para su determinación”³¹. La resistencia a la corrosión puede mejorarse incorporando aditivos clasificados como anticorrosivos.

²³ WIDMAN INTERNATIONAL SRL. ¿Qué es la viscosidad? [en línea]. Santa cruz. (10 de julio de 2018), párr. 3. Disponible en Internet: <http://www.widman.biz/Seleccion/viscosidad.html>

²⁴ LUBRICANTES GULF, Op. Cit., p. 6.

²⁵ AGUDELO LÓPEZ, Sebastián y HERNÁNDEZ BAENA, Diego Andrés, Op. Cit., p. 24.

²⁶ *Ibid.*, p. 24.

²⁷ PEREZ GALERA, José Antonio. Los aceites lubricantes [en línea]. Publicaciones didácticas. (Julio de 2015), p. 2. Disponible en Internet: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:j8jKW_yzbr4J:www.educarm.es/templates/portal

²⁸ TORBACKE, Marika. RUDOLPHI, Asa. KASSFELDT y Elisabeth. Lubricants, Introduction to properties and performance. India, 2014. p. 26. ISBN 9781118799741.

²⁹ AGUDELO LÓPEZ, Sebastián y HERNÁNDEZ BAENA, Diego Andrés, Op. Cit., p. 24.

³⁰ *Ibid.*, p. 25.

³¹ *Ibid.*, p. 25.

1.2.7 Dispersión. Se refiere a la capacidad de un aceite lubricante para mantener suspendidas las impurezas que resultan de la combustión, la corrosión, la oxidación del aceite y los contaminantes exteriores, durante su tiempo de vida útil. “Un aceite con baja calidad de dispersión, da lugar a la aglomeración o precipitación de una notable cantidad de impurezas sobre las partes del motor”³², generándole a este mismo daños irreversibles. La dispersión puede mejorarse incorporando aditivos clasificados como dispersantes.

1.2.8 Detergencia. Se refiere a la capacidad de un aceite lubricante para limpiar y evitar el depósito de impurezas dentro del motor. La detergencia puede mejorarse incorporando aditivos clasificados como detergentes.

1.2.9 Estabilidad de la espuma. Se refiere a la capacidad de un aceite lubricante para evitar y regular la formación de espumas estables, generalmente ocasionadas por la adición de aditivos detergentes o dispersantes. “La estabilidad de la espuma puede mejorarse incorporando aditivos clasificados como inhibidores de espuma”³³.

1.2.10 Demulsibilidad. Es la capacidad que tiene un aceite lubricante para separarse del agua³⁴, se mide por la agitación de una mezcla formada por partes iguales de agua y aceite, anotando el tiempo que tarda dicha separación; ésta prueba es de gran valor puesto que se sabe “el agua puede filtrarse en los tanques de almacenamiento de aceite”³⁵ y ocasionar reacciones indeseadas. La demulsibilidad puede mejorarse incorporando aditivos clasificados como demulsificantes.

1.2.11 Características de presión extrema. Se refiere a la “capacidad de un aceite lubricante para mantener sus propiedades bajo condiciones de alta presión”³⁶, esto se logra mediante la incorporación de aditivos clasificados como agentes de presión extrema.

1.2.12 Estabilidad térmica. Es la capacidad que tiene un aceite lubricante para mantenerse homogéneo bajo condiciones de alta temperatura. Se determina “calentando el aceite desde su punto de fluidez hasta 121 °C, después de este calentamiento no debe haber separación de los aditivos, usualmente indicada por un enturbiamiento del aceite”³⁷.

³² *Ibíd.*, p. 26.

³³ *Ibíd.*, p. 24.

³⁴ TORBACKE, Marika. RUDOLPHI, Asa y KASSFELDT, Elisabeth, *Op. Cit.*, p. 32.

³⁵ AGUDELO LÓPEZ, Sebastián y HERNÁNDEZ BAENA, Diego Andrés, *Op. Cit.*, p. 28.

³⁶ *Ibíd.*, p. 28.

³⁷ *Ibíd.*, p. 29.

1.2.13 Volatilidad. Se refiere a la facilidad con la que un aceite lubricante se evapora. La volatilidad depende de las propiedades fisicoquímicas de la base lubricante y “ no puede ser cambiada mediante la incorporación de algún aditivo”³⁸.

1.2.14 Punto de inflamación. Corresponde a la temperatura más baja, a la cual “los vapores sobre la superficie de un aceite lubricante se encienden en contacto con una llama abierta”³⁹, al ser retirada dicha llama los vapores se apagan. “El punto de inflamación de un aceite lubricante es típicamente 200°C o superior”⁴⁰.

1.2.15 Punto de ignición. Corresponde a la temperatura más baja, a la cual los vapores sobre la superficie de un aceite lubricante se encienden en contacto con una llama abierta y se mantienen encendidos una vez se retira dicha llama. “El punto de ignición de un aceite lubricante es típicamente 20°C o más, por encima del punto de inflamación”⁴¹.

1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES LUBRICANTES UTILIZADOS EN EL SECTOR AUTOMOTOR

Como se ha notado, los aceites lubricantes tienen un papel importante en el sector automotor, ya que por medio de su aplicación se lubrican las piezas, se limpian las impurezas y en general, se prolonga la vida útil de las máquinas. Además de los aceites lubricantes utilizados en los motores de combustión interna, existen otros tipos de aceites lubricantes que se requieren para el funcionamiento en conjunto de la máquina, a continuación, se presenta la clasificación de los aceites lubricantes utilizados en el sector automotor.

1.3.1 Aceites lubricantes para motores de combustión interna. Como se definió en el numeral 1.1, están “compuestos por una base que provee las características lubricantes primarias y aditivos que aumentan su rendimiento, eficiencia y vida útil”⁴². Su función principal es lubricar las piezas presentes dentro del motor de combustión interna, bajo las condiciones normales de operación del mismo; dicho aceite reside en el cárter del motor.

Existen tres organizaciones de estandarización que han desarrollado normas para clasificar los aceites lubricantes utilizados en el sector automotor:

- SAE (*Society of Automotive Engineers*): Sociedad de Ingenieros Automotrices.
- API (*American Petroleum Institute*): Instituto Americano del Petróleo.

³⁸ GARCÍA OROZCO, Gilbert Mauricio. Lubricantes: propiedades, aditivos y tipos [en línea]. Prueba de ruta. párr. 4. Disponible en Internet: <https://www.pruebaderuta.com/lubricantes-propiedades-aditivos-y-tipos.php>.

³⁹ NORIA LATIN AMÉRICA. Punto de inflamación de un aceite [en línea]. Lublearn. (21 de noviembre de 2014), párr. 3. Disponible en Internet: <http://noria.mx/lublearn/defina-que-es-el-punto-de-inflamacion-de-un-aceite/>

⁴⁰ TORBACKE, Marika. RUDOLPHI, Asa y KASSFELDT, Elisabeth, Op. Cit., p. 27.

⁴¹Ibíd., p. 53.

⁴² MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE, Op. cit., p. 6.

- ISO (*International Organization for Standardization*): Organización Internacional de Normalización.

En Colombia, las normas más utilizadas son las emitidas por la SAE y el API.

1.3.1.1 Sistema de clasificación de viscosidad SAE. Es un sistema de clasificación de aceites lubricantes para motores de combustión interna, basado en la viscosidad de estos mismos a diferentes temperaturas bajas y a 100°C (“temperatura idónea de funcionamiento del motor”⁴³). Fue desarrollado y emitido por la Sociedad de Ingenieros Automotrices en la norma SAE J300, la cual “establece una escala numérica, relacionada con las viscosidades máximas que garantizan una buena distribución de aceite lubricante al motor, un buen comportamiento de la bomba de aceite en el momento del arranque y la formación de una película mínima de lubricante en zonas de alta temperatura”⁴⁴, además, esta norma “regula la rotura de polímeros o cizallamiento en altas temperaturas (150°C), garantizando la protección necesaria para los cojinetes, árbol de levas y todas las piezas que requieren lubricación hidrodinámica forzada”⁴⁵.

Según la norma SAE J300, que entró en vigencia en enero del año 2015, los aceites lubricantes para motores de combustión interna se clasifican en 15 grados de viscosidad, 6 grados de invierno y 9 grados de verano, “los grados de invierno van acompañados por la letra W, haciendo referencia a la estación climatológica de invierno *Winter* en inglés y se basan en el comportamiento del aceite lubricante a bajas temperaturas; los grados de verano, no van acompañados con alguna letra y se basan en el comportamiento del aceite en altas temperaturas”⁴⁶. En el **cuadro 6**, se presenta la clasificación de los aceites lubricantes para motores de combustión interna según la norma SAE J300; conforme el grado de viscosidad SAE aumenta, el aceite es más espeso.

⁴³ ALZALLÚ SORIANO, José Antonio. Op. Cit., p. 30.

⁴⁴ LUBRICANTES GULF, Op. Cit., p. 9.

⁴⁵ WIDMAN INTERNATIONAL SRL. SAE J300 [en línea]. Santa cruz. (10 de julio de 2018), párr.4. Disponible en Internet: <https://www.widman.biz/Seleccion/j300.html>

⁴⁶ NORIA LATIN AMÉRICA. Grados de viscosidad SAE para lubricantes de motor [en línea]. Lublearn. (21 de noviembre de 2013), párr. 6. Disponible en Internet: <http://noria.mx/lublearn/entendiendo-los-grados-de-viscosidad-sae-para-lubricantes-de-motor/>

Cuadro 6. Clasificación de los aceites lubricantes para motores de combustión interna, según la norma SAE J300.

Grado SAE	Viscosidad a baja temperatura (°C), cP		Viscosidades en alta temperatura (°C)		
	Máx. arranque	Máx. De bombeo (sin esfuerzo)	Cinemática (CSt) a 100°C min.	Cinemática (CSt) a 100°C máx.	Cizallamiento (cP) a 150°C
0w	6200 a -35	60000 a -40	3.8	-	-
10W	7000 a -25	60000 a -30	4.1	-	-
15W	7000 a -20	60000 a -25	5.6	-	-
20W	9500 a -15	60000 a -20	5.6	-	-
25W	13000 a -10	60000 a -15	9.3	-	-
8	-	-	4	<6.1	1.7
12	-	-	5	<7.1	2.0
16	-	-	6.1	<8.2	2.3
20	-	-	6.9	<9.3	2.6
30	-	-	9.3	<12.5	2.9
40	-	-	12.5	<16.3	3.5 (0w-40, 5w-40, 10w-40)
40	-	-	12.5	<16.3	3.7 (15w-40, 20w-40, 25w-40, 40)
50	-	-	16.3	<21.9	3.7
60	-	-	21.9	<26.1	3.7

Fuente. WIDMAN INTERNATIONAL SRL. Clasificación de viscosidad SAE J300 [en línea]. Santa Cruz. Disponible en Internet: <https://www.widman.biz/Seleccion/j300.html>.

Cada uno de los grados de viscosidad SAE definidos en el **cuadro 4**, responde a la formulación de un aceite lubricante para motores de combustión interna, cuya aplicación será “útil en zonas sometidas a pocos cambios de temperatura ambiente a lo largo del año”⁴⁷, a estos aceites lubricantes se les denomina *aceites monogrado* y actualmente “no son muy solicitados por los fabricantes de vehículos, puesto que su funcionamiento es muy limitado”⁴⁸. Un ejemplo de aceite monogrado, es el aceite lubricante de invierno SAE 20 W, el cual solo puede ser utilizado en zonas donde la temperatura ambiente varíe a lo largo del año entre -20°C y 15 °C, de otra forma,

⁴⁷ PEREZ GALERA, José Antonio. Clasificación de los aceites lubricante. Clasificación “SAE”. [en línea]. EDUCARM. España. p. 4. Disponible en internet: www.educarm.es/templates/portal/ficheros/websDinamicas/21/clasifica_sae.doc

⁴⁸ *Ibid.*, p.4.

este aceite no cumplirá eficientemente con todas sus funciones dentro del motor de combustión interna.

Los *aceites monogrado* deben cumplir con una serie de requerimientos, dependiendo si estos son clasificados como de invierno o de verano, garantizando así una lubricación adecuada dentro del motor de combustión interna, bajo las condiciones climáticas de la zona y de operación del motor. En el **cuadro 7**, se presentan los requisitos que deben cumplir los aceites lubricantes clasificados como monógrados de invierno.

Cuadro 7. Requisitos que debe cumplir un aceite monogrado de invierno.

Requerimiento	Descripción
Arranque a bajas temperaturas	Debe permitir el arranque del motor a bajas temperaturas, en virtud de su poca resistencia al movimiento. Se evalúa según la norma ASTM D-5293-10: método de ensayo estándar para determinar la viscosidad aparente de aceites de motor entre -5 y -35, utilizando el simulador de arranque en frío.
Facilidad de bombeo	Debe tener la capacidad de fluir a través de la bomba de aceite cuando las temperaturas son bajas, . Se evalúa según la norma ASTM D-4684-08: método de ensayo estándar para determinar el esfuerzo de corte y la viscosidad aparente de aceites para motor a bajas temperaturas.
Mínimo de viscosidad a altas temperaturas	El aceite lubricante debe formar una película fluida entre las piezas en movimiento, con un requisito mínimo de viscosidad cinemática a 100°C definido por la norma SAE J300. Se evalúa según la norma ASTM D-445-11: método de ensayo estándar para determinar la viscosidad cinemática de fluidos opacos y transparentes.

Fuente. Entendiendo los grados de viscosidad SAE para lubricantes de motor [en línea]. LUBLERN, 2013. Disponible en: <http://noria.mx/lublearn/entendiendo-los-grados-de-viscosidad-sae-para-lubricantes-de-motor/>.

A diferencia de los aceites clasificados como monogrados de invierno, los aceites monogrados de verano deben cumplir con ciertos requisitos tales como intervalo de viscosidad a altas temperaturas y viscosidad a altas temperaturas. En el **cuadro 8**, se presentan los requerimientos que deben cumplir los aceites lubricantes clasificados como monógrados de invierno y de verano, respectivamente.

Cuadro 8. Requisitos que debe cumplir un aceite monogrado de verano.

Requerimiento	Descripción
Intervalo de viscosidad a altas temperaturas	<p>Cuando las temperaturas son altas, el aceite lubricante debe formar una película fluida entre las piezas en movimiento, manteniendo su viscosidad cinemática dentro de un intervalo a 100 °C, definido para cada grado en particular en la norma SAE J300.</p> <p>Se evalúa según la norma ASTM D-445-06: <i>método de ensayo estándar para determinar la viscosidad cinemática de fluidos opacos y transparentes.</i></p>
Viscosidad a altas temperaturas / alto esfuerzo cortante	<p>Debe tener la capacidad de generar un espesor de película adecuado a altas temperaturas y altos esfuerzos de corte.</p> <p>Se evalúa según las normas ASTM D-4683-10: <i>método de ensayo estándar para determinar la viscosidad a alta tasa de corte y alta temperatura por el simulador de cojinete cónico</i> y la norma ASTM D-4741-06: <i>método de ensayo para determinar la viscosidad a alta tasa de corte y alta temperatura por medio del viscosímetro de tapón cónico.</i></p>

Fuente. Entendiendo los grados de viscosidad SAE para lubricantes de motor [en línea]. LUBLERN, 2013. Disponible en: <http://noria.mx/lublearn/entendiendo-los-grados-de-viscosidad-sae-para-lubricantes-de-motor/>.

Por otra parte, según la norma SAE J300, los aceites lubricantes para motores de combustión interna que satisfacen los requerimientos de más de un grado de viscosidad SAE, se denominan *aceites multigrado* y son ampliamente utilizados actualmente, pues “su aplicación es útil en zonas sometidas a cambios importantes de temperatura ambiente a lo largo del año”⁴⁹.

Los aceites multigrado se “formulan con aditivos depresores del punto de fluidez y mejoradores del índice de viscosidad”⁵⁰, los cuales le confieren la capacidad de fluir a bajas temperaturas (evitando la formación de geles o ceras) y de estabilizar rápidamente la viscosidad frente a los cambios de temperatura. Un ejemplo de *aceite multigrado* es el clasificado como SAE 10W – 40, que a bajas temperaturas se comporta como un aceite monogrado de invierno SAE 10W y a altas temperaturas se comporta como un aceite monogrado de verano SAE 40; gracias a su aditivación, este aceite multigrado puede ser utilizado en zonas donde la temperatura ambiente varíe entre – 30°C y 40°C, un amplio rango de temperatura.

⁴⁹ *Ibíd.*, p. 4.

⁵⁰ NORIA LATIN AMÉRICA, Op. Cit., párr. 12.

En la **figura 1** se presentan los rangos de temperatura ambiente en que los aceites lubricantes para motores de combustión interna monogrado y multigrado más utilizados actualmente, satisfacen los requerimientos de la norma SAE J300.

Figura 1. Rangos de temperatura ambiente en que los aceites monogrado y multigrado satisfacen los requerimientos de la norma SAE J300.



Fuente. WESTERNRED. SAE viscosity chart [en línea]. (1 de julio de 2016). Disponible en Internet: http://theamcforum.com/forum/engine-oil-weight-viscosity_topic80601_page3.html.

1.3.1.2 Sistema de clasificación API de servicio en motores. Es un sistema de clasificación de aceites lubricantes para motores de combustión interna, desarrollado por el Instituto Americano del Petróleo (API). Clasifica a los aceites lubricantes en función del tipo de motor a lubricar: motores bencineros (combustión con gasolina) o motores Diésel (combustión con gasóleo - ACPM) y el nivel de calidad de los mismos.

En el sistema API los aceites lubricantes se identifican mediante una sigla compuesta por dos letras (categoría): la primera es la letra "S", que corresponde a los aceites utilizados en motores bencineros o la letra "C" para los aceites utilizados en motores Diésel, las letras "S" y "C" hacen referencia a las palabras chispa y

compresión en el idioma inglés; la segunda letra figura en orden alfabético e indica el nivel de calidad del aceite lubricante y “la exigencia en servicio”⁵¹ del mismo.

En los **cuadros 9 y 10** se presentan los sistemas de clasificación API de servicio en motores bencineros y Diésel, respectivamente. Se puede notar que, a través de los años, los aceites lubricantes han sido formulados para satisfacer los requerimientos básicos de lubricación de los motores de la época, sin embargo, en cada nueva formulación se busca prolongar la vida útil del motor, utilizando aditivos cada vez más eficientes.

Cuadro 9. Sistema de clasificación API para aceites lubricantes utilizados en motores bencineros.

Categoría	Estado	Servicio
SJ	Actual	Adecuado para motores de automóviles del año 2001 y anteriores.
SL	Actual	Adecuado para motores de automóviles del año 2004 y anteriores.
SM	Actual	Adecuado para motores de automóviles del año 2010 y anteriores.
SN	Actual	Brinda mayor protección a los pistones frente a la formación de depósitos en altas temperaturas, mayor control de lodos y compatibilidad conjuntas.

Fuente. OIL MATTERS. ¿Qué tipo de aceite es el adecuado para usted? [en línea]. p.3. Disponible en Internet: https://www.api.org/~media/Files/Certification/Engine-Oil-Diesel/Publications/2016-303_MotorOilGuide_Español_Lo.pdf.

Cuadro 10. Sistema de clasificación API para aceites lubricantes utilizados en motores Diésel.

Categoría	Estado	Servicio
CH – 4	Actual	Se comenzó a utilizar en el año 1998, en motores diésel de alta velocidad con ciclos de cuatro tiempos. Está diseñado para cumplir con las normas de emisiones de gases de escape del año 1998.
CI – 4	Actual	Se comenzó a utilizar en el año 2004, en motores diésel de alta velocidad con ciclos de cuatro tiempos. Está diseñado para cumplir con las normas de emisiones de gases de escape del año 2004.

⁵¹ LUBRICANTES GULF, Op. Cit., p. 19.

Cuadro 10. (Continuación).

Categoría	Estado	Servicio
CJ – 4	Actual	Utilizado en motores diésel de alta velocidad con ciclos de cuatro tiempos. Está diseñado para cumplir con las normas de emisiones de gases de escape para modelos de automóviles en carretera del año 2010 y las normas de emisiones Tier 4 para vehículos industriales.
CK - 4	Actual	Utilizado en motores diésel de alta velocidad con ciclos de cuatro tiempos. Está diseñado para cumplir con las normas de emisiones de gases de escape para modelos de automóviles en carretera del año 2017 y las normas de emisiones Tier 4 para vehículos industriales, así como para motores diésel anteriores. Brinda mayor protección contra la oxidación del aceite, la pérdida de viscosidad debido a la cizalla, hollín y aireación del aceite; la contaminación del catalizador, el bloqueo de filtros de partículas, el desgaste del motor, la formación de depósitos en pistones, entre otros.

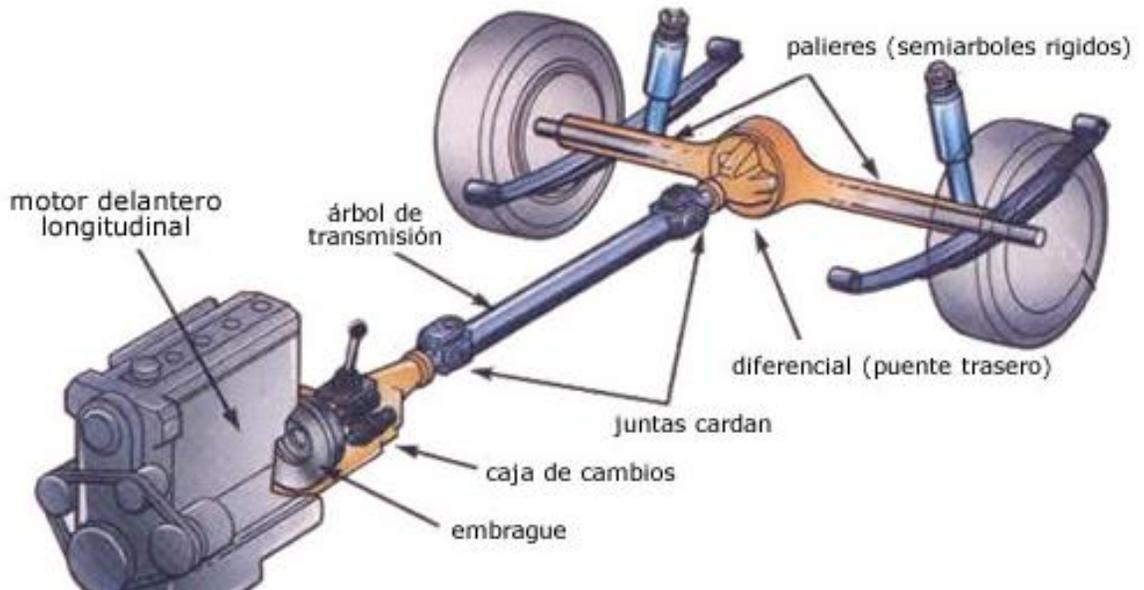
Fuente. OIL MATTERS. ¿Qué tipo de aceite es el adecuado para usted? [en línea]. p.4. Disponible en Internet: https://www.api.org/~media/Files/Certification/Engine-Oil-Diesel/Publications/2016-303_MotorOilGuide_Español_Lo.pdf.

1.3.2 Aceites lubricantes para transmisiones. En la mecánica automotriz, el sistema de transmisión de movimiento de un vehículo consiste en una serie de piezas, que tienen la función de “transmitir la energía generada en el motor a las ruedas motrices y adaptarla a las condiciones de marcha deseadas”⁵². El sistema de transmisión de un vehículo está “compuesto principalmente por el embrague, la caja de cambios o de velocidades (manual o automática), el árbol de transmisión, el grupo cónico diferencial o diferencial y los palieres o semi – árboles de transmisión”⁵³, tal como se observa en la **figura 2**.

⁵² LUBRICANTES GULF, Op. Cit., p. 19.

⁵³ RED OPERATIVA DE DESGUACES ESPAÑOLES. ¿Qué es el sistema de transmisión? [en línea]. párr. 7. Disponible en Internet: <https://www.ro-des.com/mecanica/que-es-el-sistema-de-transmision/>.

Figura 2. Sistema de transmisión de movimiento de un vehículo.



Fuente. RED OPERATIVA DE DESGUACES ESPAÑOLES. ¿Qué es el sistema de transmisión? [en línea]. Disponible en Internet: <https://www.ro-des.com/mecanica/que-es-el-sistema-de-transmision/>.

Sin embargo, los elementos del sistema de transmisión de movimiento de un vehículo que requieren lubricación directa, son la caja de cambios o de velocidades y el grupo cónico diferencial.

La *caja de cambios o de velocidades* “está constituida por una serie de engranajes y discos metálicos, que proporcionan distintas relaciones de transmisión”⁵⁴ de “movimiento entre el cigüeñal y las ruedas motrices”⁵⁵.

El *grupo cónico – diferencial*, es un “mecanismo que recibe el movimiento de la caja de cambios por medio del árbol de transmisión y lo reparte a las dos ruedas del eje según las necesidades de cada una de ellas”⁵⁶; recibe el mismo tipo de lubricación que la caja de cambios, sin embargo, los expertos recomiendan añadir en su formulación aditivos limitadores del deslizamiento.

En la caja de cambios y el grupo cónico – diferencial, los engranajes y demás piezas metálicas se encuentran en contacto y movimiento permanente durante el periodo de tiempo en que el motor del vehículo está encendido, además, dichas piezas “reciben los golpes de las ruedas, las vibraciones del cardán y del motor”⁵⁷. Por lo anterior, es imprescindible contar con un sistema de lubricación en la caja de cambios y diferenciales, que evite posibles daños en la máquina ocasionados por la

⁵⁴LUBRICANTES GULF, Op. Cit., p. 24.

⁵⁵ RED OPERATIVA DE DESGUACES ESPAÑOLES, Op. Cit., párr. 8.

⁵⁶Ibíd., p. 26

⁵⁷ WIDMAN INTERNATIONAL SRL. Cómo Seleccionar un Aceite para la Transmisión Manual [en línea]. Santa cruz. (10 de julio de 2018), párr. 1. Disponible en Internet: <https://www.widman.biz/Seleccion/manual.html>

corrosión y desgaste. Actualmente, los aceites de transmisión se clasifican en función del tipo de caja de cambio que posea el vehículo: manual o automática, respectivamente:

- Fluidos o aceites de transmisión manual (MTF).
- Fluidos o aceites de transmisión automática (ATF).

Los aceites de transmisión residen en el cárter de la caja de cambios y “son de color rojo o verde para diferenciarlos de otros fluidos del vehículo”⁵⁸.

1.3.2.1 Aceites para cajas de transmisión manual (MTF). Están compuestos por una base (mineral, sintética o semi - sintética) que provee las características lubricantes primarias y aditivos anticorrosivos y de extrema presión. Su función principal es lubricar los engranajes de las cajas de cambios manuales y el grupo cónico – diferencial, deben tener las siguientes propiedades:

- **Viscosidad adecuada:** los MTF deben tener una “viscosidad elevada para hacer frente a las condiciones de lubricación en capa límite”⁵⁹ (mantenerse en los dientes de los engranajes) y a su vez ser lo suficientemente fluidos para “desplazarse entre los sincronizadores, dejar girar a los engranajes en frío sin transmitir fuerza o causar resistencia y penetrar entre los bujes y cojinetes”⁶⁰.

La viscosidad adecuada de un aceite de transmisión se determina de acuerdo con lo descrito en la norma SAE J306, la cual establece una escala numérica relacionada con las viscosidades cinemáticas mínimas y máximas a 100 °C, que garantizan una buena distribución de aceite de transmisión a la caja de cambios y al grupo cónico diferencial.

Según la norma SAE J306, que entró en vigencia en enero del año 2005, los aceites de transmisión se clasifican en 11 grados de viscosidad SAE, 4 grados de invierno y 7 grados de verano. En el **cuadro 11**, se presenta la clasificación de viscosidad requerida para los aceites de transmisión:

Cuadro 11. Clasificación de viscosidad requerida para los aceites de transmisión, según la norma SAE J306.

Grado SAE	Temperatura máxima para viscosidad de 150000 cP (°C)	Viscosidad cinemática mínima (cSt) a 100 °C	Viscosidad cinemática máxima (cSt) a 100°C
70 w	-55	4.1	-
75 w	-40	4,1	-

⁵⁸ TOTAL. Cambio del líquido de transmisión. [en línea]. Chile), párr. 2. Disponible en Internet: <http://www.total-chile.cl/tips/cambio-de-aceite/cambio-del-liquido-de-transmision.html>

⁵⁹ LUBRICANTES GULF, Op. Cit., p. 24.

⁶⁰ WIDMAN INTERNATIONAL SRL. Op. Cit., párr. 2.

Cuadro 11. (Continuación).

Grado SAE	Temperatura máxima para viscosidad de 150000 cP (°C)	Viscosidad cinemática mínima (cSt) a 100 °C	Viscosidad cinemática máxima (cSt) a 100°C
80 w	-26	7.0	-
85 w	-12	11.0	-
80	-	7.0	<11.0
85	-	11.0	<13.5
90	-	13.5	<18.5
110	-	18.5	<24.0
140	-	24.0	<32.5
190	-	32.5	<41.0
250	-	41.0	-

Fuente. WIDMAN INTERNATIONAL SRL. Mantenimiento proactivo. Bolivia, 2018, Disponible en Internet: <https://www.widman.biz/Seleccion/j306.html>.

- **Propiedades anticorrosivas:** los MTF deben contener aditivos anticorrosivos que prevengan la corrosión y desgaste de las piezas de la caja de cambios y diferenciales.
- **Propiedades de presión extrema:** los MTF deben contener aditivos de presión extrema que le permitan lubricar las piezas de la caja de cambios y diferenciales, independientemente de las cargas y golpes generados dentro y fuera de la máquina.

En el **cuadro 12**, se presenta el sistema de clasificación emitido por el instituto americano del petróleo (API) para los aceites de transmisión manual, los cuales se identifican por las iniciales “GL”, que hacen referencia a las palabras lubricante para engranajes en el idioma inglés; el número que le sigue especifica el orden de desarrollo en la formulación de dichos aceites y corresponde a un sistema de transmisión manual.

Cuadro 12. Sistema de clasificación API para aceites de transmisión manual.

Categoría	Estado	Descripción
API GL-4	Vigente	Especifica el tipo de servicio característico de engranajes, particularmente hipoidales en automóviles y otros equipos automotrices que operan bajo condiciones de alta velocidad y bajo par de arranque; baja velocidad y alto par de arranque.

Cuadro 12. (Continuación).

Categoría	Estado	Descripción
API GL-5	Vigente	Especifica el tipo de servicio característico de engranajes, particularmente hipoidales en automóviles y otros equipos automotrices que operan bajo condiciones de alta velocidad y carga de impacto; alta velocidad y par de arranque bajo y baja velocidad y alto par de arranque.

Fuente. MOBIL. Manual de productos, Clasificación API para aceites de transmisiones y Diferenciales [en línea]. Disponible en: http://manual.mobilonline.cl/manualmobil/especificaciones_det.php?pg=2.

1.3.2.2. Aceites para cajas de transmisión automática (ATF). Están compuestos por una base (mineral, sintética o semisintética) más liviana que la de los aceites de transmisión manual y aditivos anti - corrosivos, anti - desgaste e inhibidores de espuma. Su función principal es lubricar los engranajes de las cajas de cambio automáticas y el grupo cónico – diferencial, “transmitir energía en el convertidor de par, facilitar el cambio de marchas automático y eliminar el calor generado; además, actúa como aceite hidráulico en el convertidor, a modo de embrague”⁶¹. Según Lubricantes Gulf⁶², deben tener las siguientes características:

- Índice de viscosidad elevado y estable.
- Propiedades anti-espuma, anti – desgaste, anti – corrosivas y de fricción.
- Compatibilidad de juntas y elastómeros.
- Resistencia a la oxidación.
- Estabilidad térmica.

Actualmente, las organizaciones de estandarización no cuentan con normas para la clasificación de los ATF, puesto que son los fabricantes de vehículos (General Motors, Ford Motor Company, Jeep, Jaguar, Dodge, etc.) quienes desarrollan sus propios ATF dependiendo del vehículo, sus tolerancias y diseños de ingeniería. En el **cuadro 13**, se presentan los tipos de aceites de transmisión automática desarrollados a través de los años por los fabricantes de vehículos más reconocidos, sus propiedades y sistemas de transmisión aplicables.

Cuadro 13. Aceites de transmisión automática diseñados por los fabricantes de vehículos más reconocidos.

Tipo de aceite	Descripción
ATF TIPO A	Ofrece un índice de viscosidad muy bajo (50 – 60), poca protección al desgaste y se oxida rápidamente.

⁶¹ LUBRICANTES GULF, Op. Cit., p. 25.

⁶² *Ibid.*, p. 25.

Cuadro 13. (Continuación).

Tipo de aceite	Descripción
ATF TIPO F	Diseñado para ciertas cajas automáticas de vehículos Ford® y Jaguar® hasta el año 1987 y ciertos sistemas de equipo pesado con transmisiones hidrostáticas de Borg-Warner. Se caracteriza por su alta resistencia a la oxidación.
Dexron II ®	Utilizado durante los años 1967 a 1991, en los sistemas de transmisión automática de vehículos General Motors.
Dexron III ®	Utilizado desde el año 1995. Ofrece mayor resistencia a la oxidación, a la formación de barnices y a la degradación.
Dexron III (H) ®	Diseñado para los sistemas de transmisión automática de 5 velocidades, en vehículos General Motors fabricados a partir del año 2004.
Dexron IV ®	Ofrece alta estabilidad térmica, gran poder antioxidante y buena lubricación a bajas temperaturas.
ATF Dexron VI	Diseñado para los sistemas de transmisión automática de los vehículos General Motors, fabricados a partir del año 2005. Garantiza el doble de durabilidad y estabilidad frente a los demás ATF.
ATF+3, ATF+4	Diseñados para prolongar la vida útil del embrague de los sistemas de transmisión de los vehículos Jeep, Chrysler y Dodge, gracias a su menor coeficiente de fricción dinámico.
SP-II, SP-III, SP-IV	Diseñados para los sistemas de transmisión automática de los vehículos Mitsubishi.
Toyota WS	Diseñado para los sistemas de transmisión automática de los vehículos Toyota. Se caracteriza por su baja viscosidad.
ATF Universal o Multi –vehicular	Desarrollado por la industria de lubricantes para satisfacer los requisitos de los ATF de la mayoría de marcas.

Fuente. TCMATIC. Tipos de aceite ATF para transmisiones automáticas [en línea]. Navarra, párr. 3. Disponible en Internet: <http://www.tcmatic.com/blog/tipos-de-aceite-atf-para-transmisiones-automaticas/>.

1.3.3 Aceites Hidráulicos. Permiten transmitir los esfuerzos mecánicos de la caja y los pedales hacia el motor, por medio de cambios de presión o flujo⁶³, además de disipar el calor, sellar y proteger piezas, entre otras funciones. Generalmente, los

⁶³ EATON HYDRAULICS TRAINING. Mobil Hydraulic Manual [en línea], 2006, ed. 2. p. 50. Disponible en internet: <http://www.eaton.com/contents-did/3069360/primary-file#apsl0300.pdf>.

fluidos hidráulicos son usados en transmisiones automáticas de automóviles, frenos, diferenciales, maquinaria industrial y aviones. Los aceites hidráulicos deben satisfacer una serie de requisitos⁶⁴:

- Se recomienda una viscosidad entre 12 – 80 mm²/s.
- El porcentaje de azufre debe ser mayor a 0.03%.
- El intervalo de densidad debe estar entre 0.86 – 0.90 g/mL.
- La compresibilidad a 300 bar debe ser mayor a 63×10^{-6} psi⁻¹.
- El punto de inflamabilidad debe estar por lo menos 20°C arriba de la temperatura máxima de trabajo del fluido.
- Humectación y adhesión elevadas.
- No debe contener resinas ni ácidos.

1.3.3.1 Composición. Se han utilizado aceites minerales y emulsiones de este mismo con agua para mejorar su rendimiento y extender su vida útil. En el **cuadro 14** se presentan las características de los fluidos más utilizados para la lubricación de sistemas hidráulicos.

Cuadro 14. Características de los fluidos hidráulicos.

Fluido	Características
Fluidos agua – glicol	Son mezclas en disolución del 20 al 45% de agua en etileno - propilenglicol, con aditivos anticorrosivos y antidesgaste, su temperatura de uso es limitada debido a la presencia de agua.
Aceite mineral	Son los más utilizados en maquinaria industrial debido a su buena relación temperatura/viscosidad y sus cualidades de protección sobre las piezas.
Emulsión de aceite en agua	Contienen aproximadamente 40% de agua y poseen excelentes propiedades de apagado de llama.

Fuente. DANFOSS. Hydraulic Fluids and Lubricants: Oils, Lubricants, Grease, Jelly [en línea], 2016. Disponible en: <http://files.danfoss.com/documents/520L0463.pdf>.

1.3.3.3 Clasificación. Los fluidos hidráulicos están estandarizados según las normas ISO 6743-4 y DIN 51524⁶⁵, tal como se presenta en el **cuadro 15**.

Cuadro 15. Clasificación ISO y DIN, junto con sus principales características.

Características	ISO	DIN
Aceite mineral sin aditivos	HH	H
Tipo HH + inhibidores de corrosión y oxidación	HL	HL

⁶⁴ *Ibid.*, p. 52.

⁶⁵ SVENSKA STATOIL AB. Hydraulic fluids [En línea]. Noviembre, 2018. 4 p. Disponible en: https://www.oil.sk/storage/file/products/catalogs/statoil/hydraulic_fluids_folder.pdf

Cuadro 15. (Continuación).

Características	ISO	DIN
Tipo HL + inhibidor de desgaste	HM	HLP
Tipo HLP + Detergentes	-	HLPD
Tipo HM + mejorador de viscosidad	HV	HVLP

Fuente. SVENSKA STATOIL AB. Hydraulic fluids [En línea]. Noviembre, 2018. p. 4. Disponible en: https://www.oil.sk/storage/file/products/catalogs/statoil/hydraulic_fluids_folder.pdf

La viscosidad es la característica más importante de un fluido hidráulico, debido a que esta propiedad física tiene un impacto directo en la operación del sistema hidráulico. Si la viscosidad es muy alta asimismo será la fricción que el fluido tendrá con las paredes de la tubería, además las caídas de presión, consumo de energía y generación de calor aumentarán⁶⁶. Y si por el contrario la viscosidad es menor a la requerida por el nivel ISO VG, presentadas en el **cuadro 16**, la capa de lubricante será ineficiente para prevenir el rozamiento de las partes o el sellamiento de estas⁶⁷.

Cuadro 16. Límite de viscosidades permisible por la norma ISO.

ISO VG	Viscosidad cinemática (cSt), mínima.	Viscosidad cinemática (cSt), máxima.
22	19,8	24,2
32	28,8	35,2
46	41,4	50,6
68	61,2	74,8
100	90	110
150	135	165

Fuente. ESCUELA SUPERIOR DE INGENIEROS DE SEVILLA. AUTOTALLER S.A. Lubricantes: Especificaciones y normativa. p. 24.

1.4 PRODUCCIÓN Y CONSUMO EN COLOMBIA

La producción de aceites lubricantes en Colombia se sitúa en el sector de productos de la refinación del petróleo, el cual genera cerca de 4000 empleos directos y mueve más de 1.000 millones de dólares al año en el país⁶⁸. El 73% del mercado de aceites lubricantes en sus diferentes categorías es producido en el país, el 87% de la producción nacional de aceites lubricantes es manufacturado por empresas extranjeras y el 13% por industrias nacionales⁶⁹, principalmente filiales de Ecopetrol S.A.

⁶⁶ ENGINEERS EDGE. Viscosity of Hydraulic fluid [En línea]. Par 1. Disponible en: https://www.engineersedge.com/lubrication/viscosity_index.htm

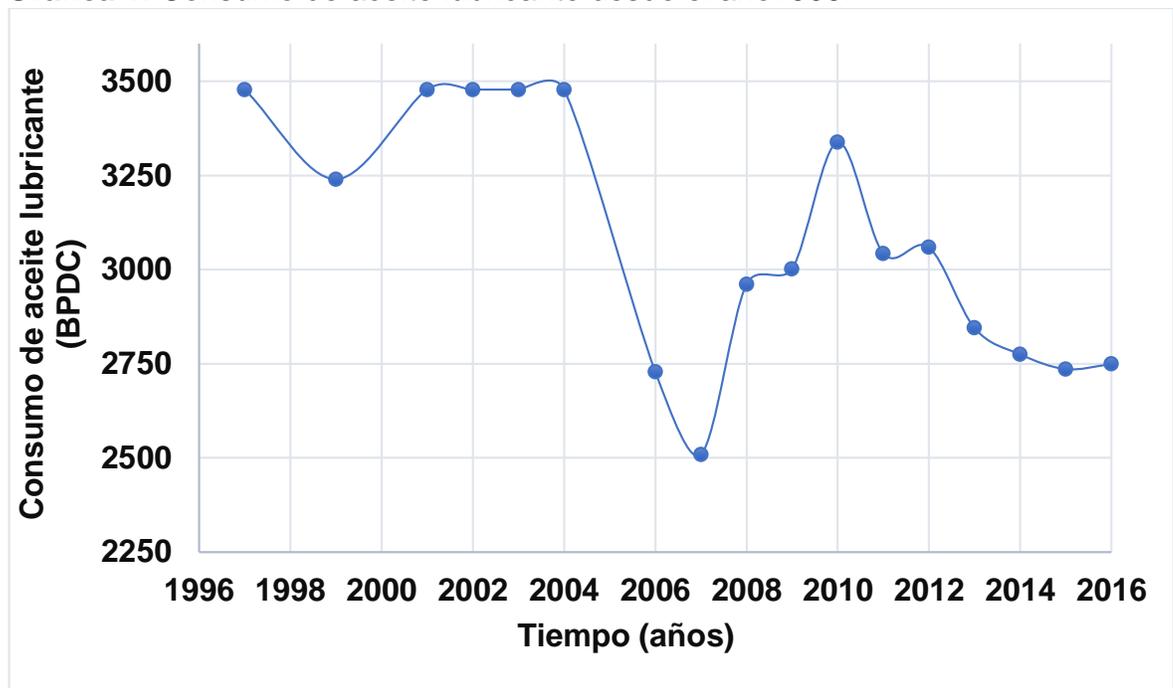
⁶⁷ ENGINEERS EDGE. Viscosity Index Review [En línea]. Par 2. Disponible en: https://www.engineersedge.com/lubrication/viscosity_index.htm

⁶⁸ DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADÍSTICA. [En línea]. Encuesta anual manufacturera. Bogotá D.C. 2016.

⁶⁹ SERNA, Marilyn y BARRERA, Isabel. Plan y estructura de Ventas Global Oil aceites y lubricantes. Trabajo de grado Gerencia de ventas. Bogotá D.C. Universidad Externado de Colombia. Facultad de administración. Departamento de Gerencia de Ventas, 2017. p. 15.

1.4.1 Consumo de aceites lubricantes en Colombia. El consumo histórico de Colombia ha disminuido gradualmente en los últimos 20 años, como se muestra en la **gráfica 1**. Para el año 1997, se consumieron 3500 BPDC de aceite lubricante; la tendencia a partir de ese año fue en descenso hasta el año 2007, donde alcanzó su pico más bajo (2500 BPDC), esto se debió en gran parte al cambio de normativa de emisiones, ya que se prohibió la venta de carros con carburador en el año 1998⁷⁰, pues estos mismos requerían cambios de aceite con mayor frecuencia: “Un motor con carburador requiere un recambio más rápido que un motor moderno debido a la combustión imperfecta que este genera. Los motores con inyección maltratan mucho menos el aceite debido a que es un computador el que calibra la mezcla y puede compensar la altura, temperatura y densidad del aire”⁷¹.

Gráfica 1. Consumo de aceite lubricante desde el año 1996.



Fuente. ASOCIACIÓN COLOMBIANA DEL PETROLEO. Informe estadístico petrolero [En línea]. Ventas de lubricantes BPDC. Marzo, 2018. Disponible en: <https://acp.com.co/web2017/es/publicaciones-e-informes/informe-estadistico-petrolero>.

Por medio del Registro Único Nacional de Transito (RUNT), se estimó la cantidad de vehículos, motos, camiones y maquinaria que hay en el país para el año 2017, se contabilizaron un total de 13.637.592⁷². Ese parque automotor e industrial

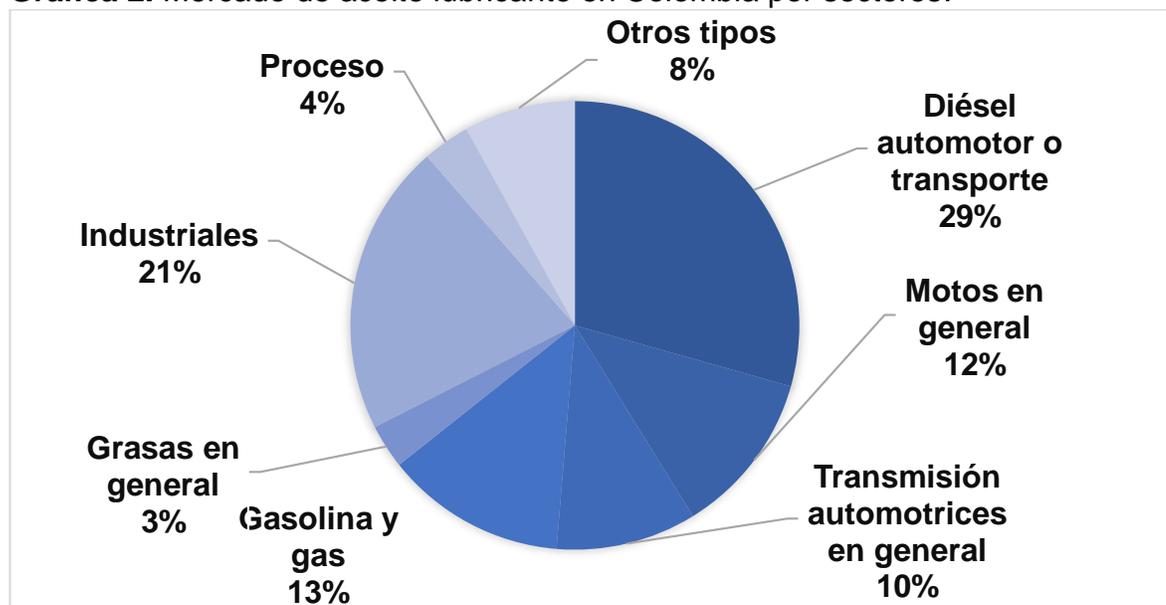
⁷⁰MASERATIGRANTURISMO. [En línea]. ¿Carro viejo de carburador en lugar de inyección? En: El Tiempo. Bogotá D.C. 26, marzo, 2015. Disponible en: <http://blogs.eltiempo.com/todo-sobre-autos/2015/03/26/carro-viejo-de-carburador-en-lugar-de-inyeccion-analisis-y-cuidados/>.

⁷¹EL TIEMPO. [En línea]. Guía técnica y práctica sobre los aceites para motores. En: El Tiempo. Bogotá D.C. 8, septiembre, 2008. Disponible en: <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-4568369>.

⁷² MINISTERIO DE TRANSPORTE. Estadísticas del RUNT: Parque automotor registrado en el RUNT [En línea]. Disponible en:

requirió para el año 2016 un total de 990,000 barriles de aceite lubricante, dividido en siete categorías de consumo; aviación, diésel, automotor, transmisión automotriz, grasas industriales y procesos. En la **gráfica 2**, se muestra el consumo de aceite lubricante por sectores durante el año 2016, donde el sector de carga e industrial son los principales consumidores, acaparando la mitad del consumo.

Gráfica 2. Mercado de aceite lubricante en Colombia por sectores.



Fuente. ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE PETROLEO. Informe estadístico petrolero [En línea]. Ventas nacionales de lubricantes por tipo. Marzo, 2018. Disponible en: <https://acp.com.co/web2017/es/publicaciones-e-informes/informe-estadistico-petrolero>.

Las ciudades principales tales como Bogotá, Medellín, Cali, Bucaramanga y Barranquilla, son los principales centros de consumo de aceite lubricante, pues es donde se concentran la mayoría de vehículos y zonas industriales del país, tal como se observa en el **cuadro 17**, donde se presenta el consumo de aceite lubricante en las principales zonas geográficas del país.

Cuadro 17. Consumo de aceite lubricante en Colombia por zonas geográficas.

Zona geográfica	Barriles	Porcentaje de Participación
Zona Central-Bogotá	220,882	35%
Zona Occidente-Medellín	82,084	13%
Zona Sur-Cali	62,412	10%
Zona Costa Norte	194,653	31%
Zona Nororiente-B/manga	67,018	11%

Fuente. ORTIZ, Oscar. Evaluación de la gestión integral del manejo del aceite usado vehicular en Bogotá. Proyecto de grado para optar por el título de Maestría Gestión Ambiental. Pontificia Universidad Javeriana. 2007. p. 26.

https://www.runt.com.co/cifras?field_fecha_de_la_norma_value%5Bvalue%5D%5Byear%5D=2017&field_grafica_value=5

1.4.2 Producción de aceites lubricantes. La producción nacional de aceites lubricantes satisface el 73% de la demanda interna del país, los principales fabricantes de aceites como se observa en el **cuadro 18**, son compañías extranjeras con operaciones de producción y distribución, las empresas colombianas captan el 13% del mercado y se importa el 10% de la demanda nacional⁷³.

Cuadro 18. Producción y participación en el mercado por empresa.

Empresa	País	Barriles producidos	Porcentaje de participación
ExxonMobil	Estados Unidos	358,000	42,4
Chevron Petroleum	Estados Unidos	220,870	26,1
Ecopetrol	Colombia	111,500	13,2
Terpel	Chile	101,000	12,0
Petrobras	Brasil	42,900	5,1
Brenntag	Alemania	7,160	0,8
Oxxe	Estados Unidos	3,600	0,4

Fuente. SERNA, Marilyn y BARRERA, Isabel. Plan y estructura de Ventas Global Oíl aceites y lubricantes. Trabajo de grado Gerencia de ventas. Bogotá D.C. Universidad Externado de Colombia. Facultad de administración. Departamento de Gerencia de Ventas, 2017. P 16.

1.5 ACEITES LUBRICANTES USADOS

Como consecuencia del servicio prestado por los aceites lubricantes durante su vida útil, estos pierden sus propiedades lubricantes y de protección, a la vez que adquieren grandes concentraciones de “metales pesados, solventes clorados, hollín, subproductos de la combustión incompleta, agua e impurezas exteriores”⁷⁴. Según la ley 253 del año 1996⁷⁵, la presencia de dichos elementos en la matriz de un aceite lubricante le confiere las propiedades de residuo peligroso y por tanto su disposición debe ser controlada legalmente, pues el manejo inadecuado de esta sustancia afecta la salud de los seres vivos y el ambiente. Cabe señalar que “un litro de aceite usado contamina 1000 m³ de agua”⁷⁶.

1.5.1 Contaminantes. La contaminación de la matriz de un aceite lubricante es ocasionada por la oxidación y desgaste de las piezas metálicas del sistema de lubricación, “la abrasión generada por los contaminantes exteriores que ingresan al sistema de lubricación”⁷⁷, la degradación de los aditivos y la combustión incompleta.

⁷³ SERNA, Marilyn y BARRERA, Isabel. Op. cit., p. 16.

⁷⁴ TORMOS, Op. Cit., p. 38.

⁷⁵ COLOMBIA. CONGRESO DE LA REPÚBLICA. Ley 253 (17, enero,1996). Op. cit., anexo 1.

⁷⁶ ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE PETROLEO. Fondo de Aceites Usados. Panorama general del aceite lubricante usado, Op. Cit., diapositiva 6.

⁷⁷ TORMOS, Op. Cit., p. 12.

En el **cuadro 19**, se presentan los contaminantes típicos encontrados en los análisis de aceites lubricantes usados, mediante la técnica de espectrometría⁷⁸ y su respectivo origen.

Cuadro 19. Contaminantes típicos de los aceites lubricantes usados.

Contaminante	Origen
Agua	Combustión.
Hidrocarburos polinucleares aromáticos	Combustión incompleta.
Hidrocarburos livianos	Dilución del combustible.
Plomo	Gasolina plomada – Desgaste de piezas.
Bario	Degradación de aditivos detergentes.
Calcio	Degradación de aditivos detergentes.
Magnesio	Degradación de aditivos detergentes.
Zinc	Degradación de aditivos antidesgaste y antioxidantes.
Fósforo	Degradación de aditivos antidesgaste y antioxidantes.
Hierro	Desgaste.
Cromo	Desgaste.
Níquel	Desgaste.
Aluminio	Desgaste.
Cobre	Desgaste.
Silicio	Degradación de aditivos.
Estaño	Desgaste.
Cloro	Degradación de aditivos – Gasolinas plomadas.
Azufre	Combustión.

Fuente. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Managing used oil, advice for small businesses [en línea]. 1996, Estados Unidos. Disponible en: <https://archive.epa.gov/wastes/conservation/materials/usedoil/web/pdf/usedoil.pdf>. 3 p

1.5.2 Propiedades. Las propiedades físicas y químicas de los aceites lubricantes se modifican hasta el momento en que estos finalizan su vida útil y deben ser reemplazados, una evidencia de esto se presenta en el artículo “aplicación de mantenimiento predictivo: análisis de aceite usado en un motor de combustión interna”⁷⁹, donde el autor reporta que conforme aumenta el número de horas de operación del motor, la viscosidad del aceite lubricante disminuye, la contaminación

⁷⁸ FIGUEROA SALGADO, Simón; SERRANO RICO, Juan y MORENO CONTRERAS, Gonzalo. Mantenimiento predictivo de motores mediante análisis de aceite [en línea]. En: Revista Colombiana de Tecnologías de Avanzada. Universidad de Pamplona, 2009, vol. 1, no. 13, p. 92. Disponible en Internet: http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portallG/home_40/recursos/03_v13_18/revista_13/04112011/12.pdf. ISSN.1692-7257.

⁷⁹ SALDIVIA, Francisco. Aplicación de mantenimiento predictivo. Caso estudio: análisis de aceite usado en un motor de combustión interna [en línea]. En: memorias de la undécima conferencia de ingeniería y tecnología en Latinoamérica y el caribe. Innovación en ingeniería, tecnología y educación para la competitividad y prosperidad. Agosto 14 – 16 de 2013, p. 4. Disponible en Internet: <http://laccei.org/LACCEI2013-Cancun/RefereedPapers/RP264.pdf>.

por combustible, metales pesados y hollín aumenta y su coloración se torna más oscura.

En la **tabla 1**, se presentan las propiedades típicas de un aceite lubricante usado del sector automotor:

Tabla 1. Propiedades típicas de un aceite lubricante usado del sector automotor.

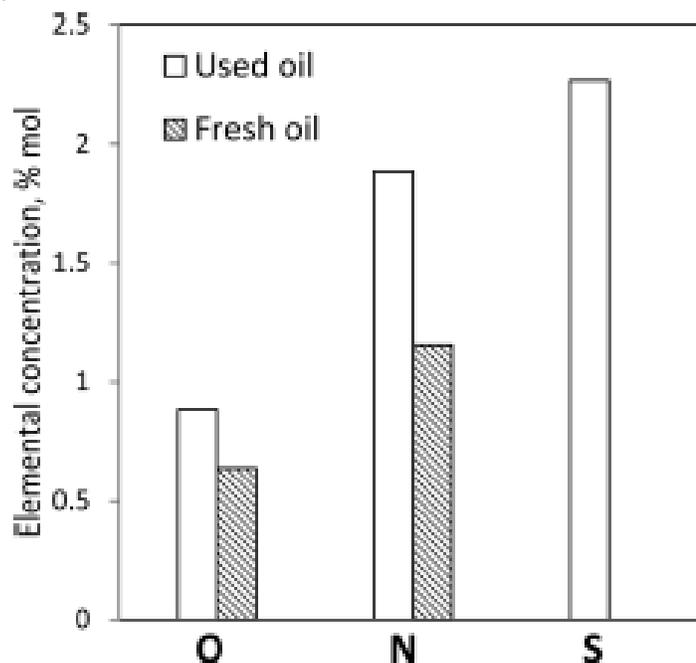
Propiedad	Automotor
Viscosidad a 40°C, SSU	97 – 120
Gravedad a 15.6°C, API	19 – 22
Peso específico a 15,6°C	0.9396 – 0.8692
Agua, %vol.	0.2 – 33.8
Insolubles en benceno, %peso	0.1 – 4.2
Solubles en gasolina, %vol.	0.56 – 33.3
Punto de ignición, °C	78 - 220
Potencia calorífica, MJ/Kg	31.560 – 44.880

Fuente. UNIDAD DE PLANEACIÓN POLÍTICA MINERO ENERGÉTICA. Transformación de los aceites usados para su utilización como energéticos en procesos de combustión [en línea]. Colombia. 2001. p.3. Disponible en Internet: <https://bdigital.upme.gov.co/handle/001/1219>.

Kupareva, Maki-Arvela, et al⁸⁰, estudiaron los cambios en la composición del aceite lubricante luego de finalizar su vida útil y concluyeron que “el cambio en la estructura de hidrocarburos del aceite de motor es insignificante. La composición del aceite lubricante nuevo es: 99,7% hidrocarburos alifáticos, 0,27% hidrocarburos aromáticos y 0,03% de hidrocarburos olefínicos mientras que el del ALU es: 98,9% hidrocarburos alifáticos, 0,94% hidrocarburos aromáticos y 0,08% de hidrocarburos olefínicos”. El desgaste dentro del motor no afecta en sí a la estructura de hidrocarburos del aceite lubricante, pero si a sus aditivos, en la **figura 3** se presentan las concentraciones molares de oxígeno, nitrógeno y azufre del ALU y del lubricante nuevo, que varían principalmente por el desgaste de los aditivos y por el arrastre de combustible y hollín.

⁸⁰KUPAREVA, Antonia. MAKI-ARVELA, Paivi. Et al. Chemical Characterization of lube oil. Energy and Fuels. ACS Publications. 13, diciembre de 2012. p. 28. DOI: 10.1021/ef3016816.

Figura 3. Concentración molar de S, O y N de ALU y lubricante nuevo.



Fuente. KUPAREVA, Antonia. MAKI-ARVELA, Paivi. Et al. Chemical characterization of lube oil. Energy and Fuels. ACS Publications. 13, diciembre de 2012. p.33.

El aumento del oxígeno se debe al proceso de degradación oxidativa⁸¹ y el nitrógeno y azufre por la presencia de estos en el combustible. En Colombia el porcentaje de azufre puede llegar a ser mayor debido a que el diésel por norma contiene 50 ppm de este elemento a diferencia con la normativa europea que es de 10 ppm⁸². El nitrógeno puede variar dependiendo del combustible.

1.5.2.1 Nitración. Ciertos compuestos de los gases de combustión como el óxido nítrico (NO) y el dióxido de nitrógeno (NO₂), pueden reaccionar con el aceite lubricante en la cámara de combustión y debido a las altas temperaturas se forman compuestos de nitrógeno inestables y órgano-nitritos, que aumentan la velocidad de degradación del aceite, formando lodos y barnices indeseados⁸³.

1.5.2.2 Oxidación. Cuando el aceite lubricante entra en contacto con un elemento oxidante, ocurre una reacción catalizada por las altas temperaturas y la presencia

⁸¹ GÓMEZ ESTRADA, Yesid Antonio. Op. Cit., p. 21.

⁸² ECOPETROL. Monitoreo de la calidad de los combustibles en Colombia. Informe Bogotá [En línea]. 2014. Disponible en:

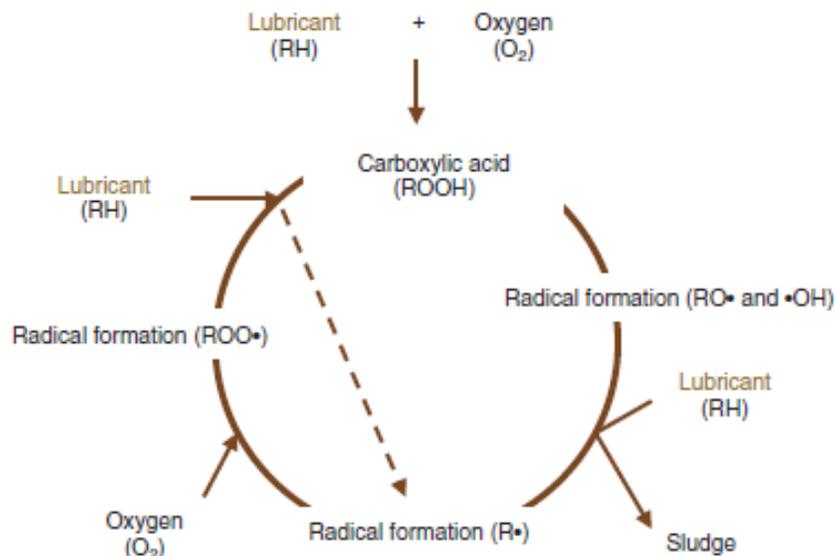
https://www.ecopetrol.com.co/documentos/80480_Contenido_de_Azufre_en_Diesel_Bogot%C3%A11.pdf

⁸³ GÓMEZ ESTRADA, Yesid Antonio. Contribución al desarrollo y mejora para la cuantificación de la degradación en aceites lubricantes usados de MCI A a través de la técnica de espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Tesis para optar por el título de PhD en sistemas de medio de transporte. Valencia, 2013, Universidad Politécnica de Valencia. p. 39.

de oxígeno que altera su estructura molecular. De esta manera la acidez del aceite lubricante aumenta, modificando así su capacidad para formar películas de lubricación⁸⁴.

El mecanismo de oxidación presentado en la **figura 4**, ocurre cuando la base del lubricante compuesta principalmente de hidrocarburos, reacciona con el oxígeno presente en la atmósfera a temperaturas superiores de 400°C, formando ácidos carboxílicos. A partir de estos ácidos, se generan radicales alcoxi e hidroxilos que posteriormente reaccionan de nuevo con la base lubricante para formar lodo y radicales peroxilo. Los radicales peroxilo inician de nuevo la formación de radicales y continúan el proceso de oxidación⁸⁵.

Figura 4. Ciclo de oxidación de los aceites lubricantes.



Fuente. TORBACKE, Marika. RUDOLPHI, Asa y KASSFELDT, Elisabeth, Lubricants, Introduction to properties and performance. p.36.

1.5.2.3 Sulfatación. Al igual que la nitración, la sulfatación es un fenómeno que ocurre en la cámara de combustión, en donde el aceite lubricante y los óxidos de azufre (SO_x), reaccionan para formar compuestos órgano azufrados indeseables⁸⁶.

1.5.3 Generación y recolección. Durante la operación del motor, es normal que se generen pérdidas en volumen de aceite lubricante, los fabricantes de aceites usados aseguran que “el máximo de consumo puede llegar a ser de 1 litro cada 1000 kilómetros”.⁸⁷

⁸⁴ *Ibíd.*, p. 35.

⁸⁵ TORBACKE, Marika. RUDOLPHI, Asa y KASSFELDT, Elisabeth, *Op. Cit.*, p. 36.

⁸⁶ *Ibíd.*, p. 44.

⁸⁷ ÁLVAREZ, Sergio. ¿Por qué consumen aceites los coches? Desmontando mitos y resolviendo dudas [en línea]. En: *Diario Motor*. 1, junio, 2016. p. 2. Disponible en: <https://www.diariomotor.com/2016/06/01/consumo-aceite-coche/>.

1.5.3.1 Causalidad de las pérdidas. La disminución del volumen del aceite de motor tiene múltiples variables de causalidad, desde las prácticas de conducción hasta daños serios en el motor. En el **cuadro 20**, se enuncian y denota su normalidad dentro de la operación del motor.

Cuadro 20. Descripción y ubicación de las pérdidas de aceite lubricantes en el vehículo.

Pérdida	Descripción	¿Común?
Inyectores	Debido a una incorrecta orientación de estos o fugas en alguna de las líneas.	NO
Motor	Cuando el motor está bajo compresión o tiene algunos de los segmentos en mal estado, aumenta el consumo de lubricante.	NO
Válvulas de admisión y escape	Los vástagos de las válvulas tienen un sello de hule que evita que pase aceite a la cámara de combustión, pero siempre queda una mínima capa de aceite que se quema en la cámara de combustión.	SI
Cigüeñal	Una delgada capa de aceite alcanza a salir a través de los retenes.	SI
Cárter	Fuga en el Carter inferior, donde se almacena el aceite lubricante.	NO

Fuente. MOTORSERVICE. Consumo y pérdida de aceite [En línea]. 2da edición. Artículo, 50003605-04. Octubre, 2014. Disponible en: https://www.ms-motorservice.com/fileadmin/media/MAM/PDF_Assets/Consumo-y-p%C3%A9rdida-de-aceite_51745.pdf

La suma de las pérdidas intrínsecas en el ciclo de combustión interna manejan un porcentaje teórico de 35% a 47%⁸⁸, lo que significa que máximo se puede recuperar el 65% del aceite lubricante de motor utilizado en un vehículo.

1.5.3.2 Sistema de Gestión. La meta de recolección de aceites lubricantes usados en el país, se fija en relación a las pérdidas de aceite en los procesos del motor. Según el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, para el año 2005, el porcentaje de aceite lubricante recuperable se fijó en 53%⁸⁹.

El esquema de recolección consta de dos actores dentro de la cadena: *generadores o acopiadores*, los cuales se encargan de almacenar el aceite lubricante usado bajo condiciones de manejo adecuadas y los *operadores*, que recolectan el aceite almacenado por los acopiadores o generadores, lo transportan y lo procesan para transformarlo en aceite usado tratado que puede ser usado nuevamente como combustible industrial o base lubricante.⁹⁰

⁸⁸ COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Gestión de aceites usados en Colombia [diapositivas]. Diapositiva 15. Bogotá D.C. Colombia.

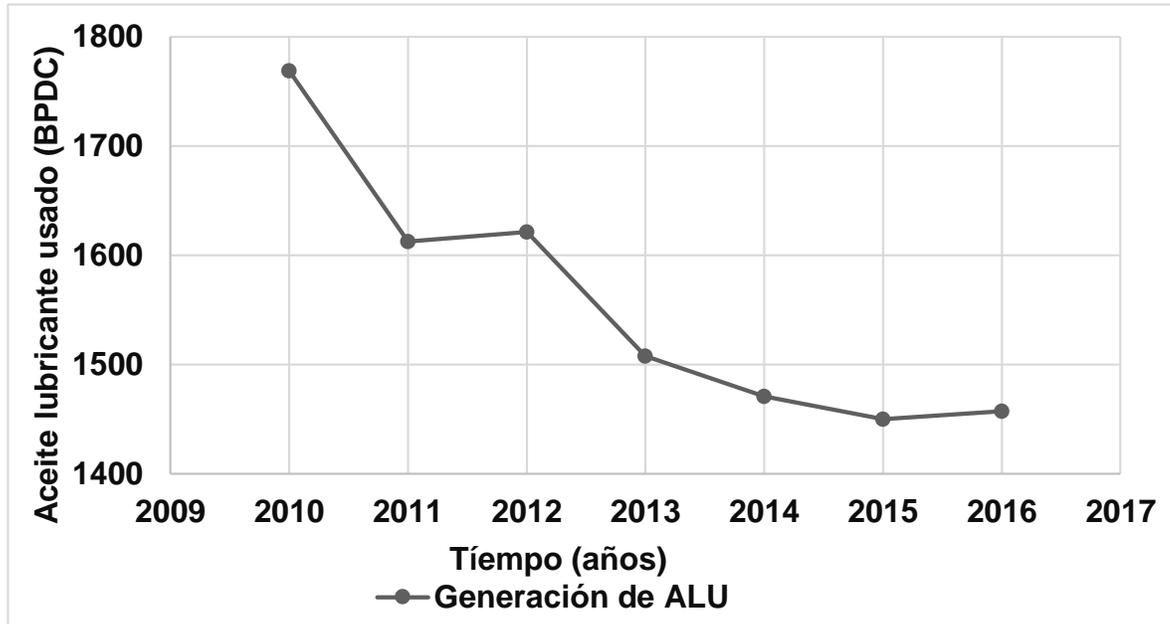
⁸⁹ *Ibid.*, diapositiva 15.

⁹⁰ ASOCIACIÓN COLOMBIANA DEL PETRÓLEO. Esquema de recolección en la cadena de gestión del aceite usado [en línea]. Bogotá D.C. Colombia, 3, octubre, 2017. Disponible en: <https://acp.com.co/web2017/es/lubricantes/374-fondo-de-aceites-usados-fau>.

1.5.3.3 Cifras. Del total de aceites lubricantes consumidos en Colombia, el 53% se convierte en aceite lubricante usado y el resto se pierde en fugas, combustión del aceite, perdidas por rozamiento, entre otras.

En la **gráfica 3**, se presenta el histórico de aceite lubricante usado generado desde el año 2010 hasta el año 2016 en el territorio nacional.

Gráfica 3. Generación de aceite lubricante usado entre el año 2010 y 2016.



Fuente. ASOCIACIÓN COLOMBIANA DEL PETRÓLEO. Panorama general del aceite lubricante usado [En línea]. Bogotá. Abril, 2018. Disponible en: <https://acp.com.co/web2017/es/informe-del-fau/240-fau-informe-2017/file>

En el **cuadro 21**, se presentan los operadores avalados por el Fondo de Aceites Usados para el año 2018 en Bogotá. El Fondo de Aceites Usados es un proyecto de autogestión ambiental que busca la responsabilidad social de los fabricantes de lubricantes, con el fin de promover buenas prácticas ambientales y generar negocios económicamente sostenibles, para disponer de manera correcta el aceite lubricante usado⁹¹.

Cuadro 21. Operadores avalados por el FAU para el 2018 en Bogotá.

Gestor	Actividad
C.I.ESAPETROL S.A	Procesador/Movilizador
ECOLCIN S.A.S	Procesador/Movilizador

⁹¹ MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Programas voluntarios de recolección posconsumo [en línea]. Bogotá D.C, Colombia. Disponible en: <http://www.minambiente.gov.co/index.php/normativa/10-asuntos-ambientales-y-sectorial-y-urbana/asuntos-ambientales-y-sectorial-y-urbana-articulos/189-plantilla-asuntos-ambientales-y-sectorial-y-urbana-17>.

Cuadro 21. (Continuación).

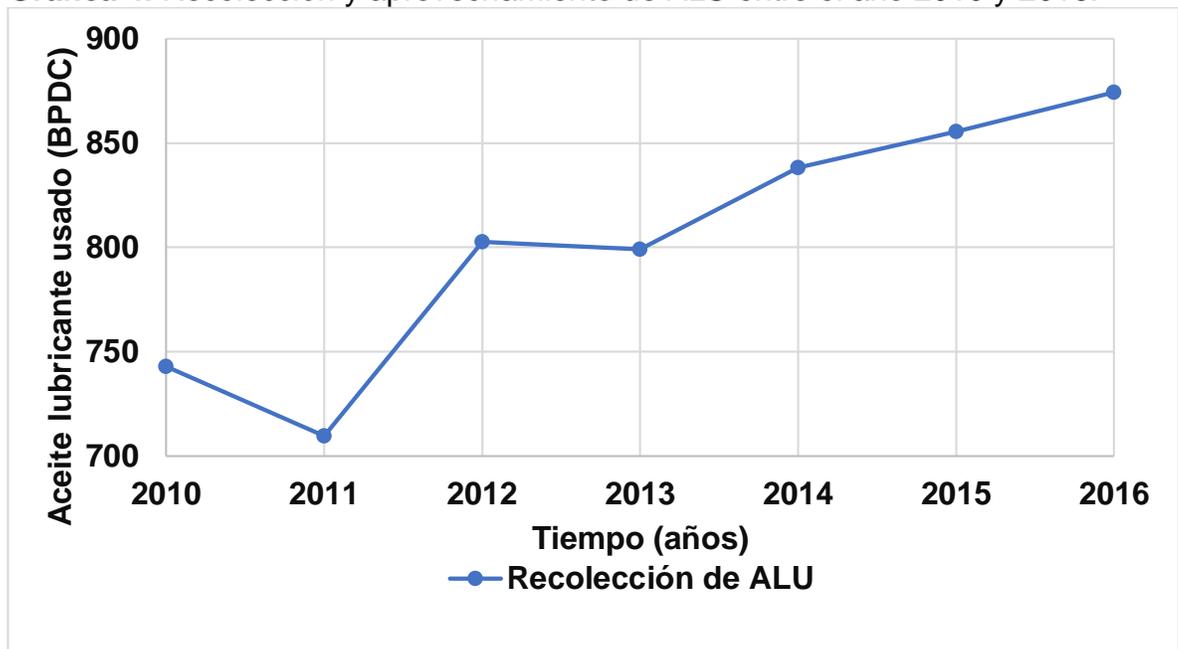
Gestor	Actividad
ECOFUEL	Procesador/Movilizador
RECIPROIL LTDA	Procesador/Movilizador
RECUPERADORA GARCIA OBREGON	Movilizador

Fuente. ASOCIACIÓN COLOMBIANA DEL PETRÓLEO. Panorama general del aceite lubricante usado [En línea]. Bogotá. Abril, 2018. 13 p. Disponible en: <https://acp.com.co/web2017/es/informe-del-fau/240-fau-informe-2017/file>

Además de los operadores mencionados en el **cuadro 21**, existen doce operadores más avalados por el FAU en Colombia. Algunos de estos operadores están en disposición de tratar y valorizar el ALU, para utilizarlo como combustible dentro de calderas u hornos industriales bajo los estándares de la Resolución 1446 del 2005.

En la **gráfica 4**, se presentan los BPDC recolectados y dispuestos de manera correcta entre el periodo del 2010 al 2016 por parte de los operadores, aprovechadores y transportadores. Para el año 2016 se recolectó el 65% del total del ALU generado en el país, alcanzando el máximo histórico de este programa posconsumo.

Gráfica 4. Recolección y aprovechamiento de ALU entre el año 2010 y 2016.



Fuente. ASOCIACIÓN COLOMBIANA DEL PETRÓLEO. Panorama general del aceite lubricante usado [En línea]. Bogotá. Abril, 2018. p. 9. Disponible en: <https://acp.com.co/web2017/es/informe-del-fau/240-fau-informe-2017/file>

1.5.4 Legislación ambiental vigente. En el convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación, se

declaró a nivel mundial que “los aceites usados de origen automotor e industrial, son un residuo peligroso que debe controlarse debido a la gran cantidad de contaminantes perjudiciales para el ambiente y para la salud del ser humano”⁹². En Colombia, el convenio de Basilea se aprobó mediante la ley 253 de 1996 y a partir de ese año se comenzó a regular toda actividad relacionada con dicho residuo peligroso:

Decreto 1697 de 1997: “se establecen los casos en los cuales se permite la utilización de aceites usados como combustible en hornos y/o calderas y las condiciones técnicas bajo las cuales se llevaría a cabo dicha actividad”⁹³.

Resolución 415 de 1998, artículo 5: “todas las industrias, obras o actividades que pretendan utilizar en sus hornos o calderas, aceites de desecho como combustible único o mezclados con otros tipos de combustibles, requerirán permiso previo de emisión atmosférica o la modificación parcial del permiso vigente con el que cuenten”⁹⁴.

Ley 491 de 1999: se advierte que “el generador que elimine los aceites usados de manera incorrecta, está incurriendo en un delito y será penalizado”⁹⁵.

Resolución 318 del 2000 – DAMA: se establecen las “condiciones técnicas para el manejo, almacenamiento, transporte, utilización y disposición de los aceites usados, por otra parte se dictan los procedimientos de separación, almacenamiento, envasado, etiquetado, registro, responsabilidades y planes de contingencia contra posibles derrames de aceites usados sobre los cuerpos de agua”⁹⁶.

Resolución DAMA 2069 del 2000: “se obliga a los propietarios o administradores de las estaciones de servicio y establecimientos afines, a informar a sus trabajadores sobre los procedimientos de almacenamiento, transporte y disposición de los aceites usados”⁹⁷.

Decreto 1609 de 2002: “se reglamenta el manejo y transporte terrestre automotor de mercancías peligrosas por carretera”⁹⁸.

⁹² COLOMBIA. CONGRESO DE LA REPÚBLICA. Ley 253 (17, enero, 1996), Op. Cit., preámbulo.

⁹³ *Ibíd.*, p. 18.

⁹⁴ COLOMBIA. MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE. Resolución 415 (13, mayo, 1998). Por la cual se establecen los casos en los cuales se permite la combustión de los aceites de desecho y las condiciones técnicas para realizar la misma [en línea]. Bogotá, D.C., p. 2. Disponible en Internet: http://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadYServiciosEcosistemicos/pdf/Normativa/Resoluciones/res_0415_130598.pdf

⁹⁵ ORTIZ MEDINA, Op. Cit., p. 18.

⁹⁶ *Ibíd.*, p. 19.

⁹⁷ *Ibíd.*, p. 19.

⁹⁸ COLOMBIA. PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA. Decreto 1609 (31, julio, 2002). Por la cual se reglamenta el manejo y transporte terrestre automotor de mercancías peligrosas por carretera. [en línea]. Bogotá, 2002. Disponible en Internet: <https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?dt=S&i=6101>

Resolución DAMA 1188 de 2003: “se divulga el manual de normas y procedimientos para la gestión de aceites usados en Colombia”⁹⁹.

Resolución 1446 de 2005, artículos 2 y 3: “establece los requisitos y condiciones para aprovechar como combustible el aceite usado generado en el país”¹⁰⁰, “el tratador de aceites usados deberá realizar cada cuatro meses la caracterización del aceite usado tratado y/o sin tratar según sea el caso y archivar hasta por 3 años los resultados de dichos análisis de laboratorio”¹⁰¹.

Decreto 4741 de 2005, artículos 5, 10, 14, 19 y 28: “La mezcla de un residuo o desecho peligroso con uno que no lo es, le confiere a este último características de peligrosidad y debe ser manejado como residuo o desecho peligroso”¹⁰², “el generador debe garantizar la gestión y el manejo integral de los residuos o desechos peligrosos que genera; elaborar un plan de gestión integral; identificar las características de peligrosidad de cada uno de estos desechos o residuos; registrarse ante la Autoridad Ambiental competente; capacitar al personal encargado de la gestión y manejo; contar con un plan de contingencia actualizado; conservar las certificaciones de almacenamiento, aprovechamiento, tratamiento o disposición final que emitan los respectivos receptores, hasta por un tiempo de 5 años; tomar todas las medidas de carácter preventivo o de control previas al cese, cierre, clausura o desmantelamiento de su actividad”¹⁰³, “se debe garantizar el manejo seguro y responsable de los envases, empaques, embalajes y residuos del producto o sustancia química con propiedad peligrosa; declarar a los consumidores y a los receptores el contenido químico o biológico de los residuos o desechos peligrosos que su producto o sustancia pueda generar; comunicar el riesgo de las sustancias o productos con propiedad peligrosa a los diferentes usuarios o consumidores”¹⁰⁴. “El responsable de la contaminación de un sitio por efecto del manejo o la gestión inadecuada de residuos o desechos peligrosos, estará obligado a diagnosticar, remediar y reparar el daño causado a la salud y al medio ambiente”¹⁰⁵, “los generadores de residuos o desechos peligrosos están obligados

⁹⁹ *Ibíd.*, p. 19.

¹⁰⁰ COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Resolución 1446 (5, octubre, 2005). Por la cual se modifica parcialmente la resolución 415 del 13 de marzo de 1998, que establece los casos en los cuales se permite la combustión de aceites de desecho o usados y las condiciones técnicas para realizar la misma [en línea]. Bogotá: El ministerio, 2005. p. 3. Disponible en Internet: <http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/app/resoluciones/b0-Resoluci%C3%B3n%201446%20de%202005%20-%20Modifica%20Resoluci%C3%B3n%20415%20de%201998.pdf>

¹⁰¹ *Ibíd.*, p. 3.

¹⁰² COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Decreto 4741 (30, diciembre, 2005). Por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y el manejo de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral [en línea]. Bogotá D.C.: El ministerio, 2005. p. 3. Disponible en Internet: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=18718>.

¹⁰³ *Ibíd.*, p. 5.

¹⁰⁴ *Ibíd.*, p. 7.

¹⁰⁵ *Ibíd.*, p. 13.

a inscribirse en el Registro de Generadores de la Autoridad Ambiental competente de su jurisdicción”¹⁰⁶.

Ley 1252 de 2008, artículo 2 y 4: “Se deben diseñar planes, sistemas y procesos adecuados, limpios y eficientes de tratamiento, almacenamiento, transporte, reutilización y disposición final de residuos peligrosos, que propendan al cuidado de la salud humana y el ambiente; implementar estrategias y acciones para sustituir los procesos de producción contaminantes por procesos limpios y aprovechar al máximo los residuos peligrosos susceptibles de ser devueltos al ciclo productivo como materia prima”¹⁰⁷, “queda prohibida la introducción, importación o tráfico de residuos o desechos peligrosos al territorio nacional por parte de cualquier persona natural o jurídica, de carácter público o privado. De igual forma, será prohibida la disposición o recepción final de residuos peligrosos en rellenos sanitarios que no cumplan con la capacidad o condiciones físicas y técnicas adecuadas para tal fin”¹⁰⁸.

Resolución 909 de 2008, artículo 93: “Cuando una actividad industrial o equipo de combustión externa utilice aceite usado como combustible, debe cumplir con los estándares de emisión admisibles para Cadmio y Plomo, adicional al cumplimiento de los estándares de emisión admisibles para la respectiva actividad industrial o equipo de combustión externa, establecidos en la presente resolución”¹⁰⁹.

Resolución 6982 de 2011, artículo 5 y 6: “se prohíbe la utilización de aceite usado no tratado, como combustible en ninguna proporción o mezcla en equipos de combustión externa y hornos con capacidad térmica menor o igual a 10 Megavatios, como tampoco en equipos en los que se adelanten procesos para la elaboración de productos alimenticios para el consumo humano o animal, cuando los gases de combustión estén en contacto con los alimentos”¹¹⁰; “se permitirá el uso de aceites usados tratados como combustible, siempre y cuando el mismo provenga de empresas que cuenten con la respectiva licencia ambiental para dicho proceso”¹¹¹.

Decreto 2041 de 2014, artículo 9: se establece que “la construcción y operación de instalaciones cuyo objeto sea el almacenamiento, tratamiento, aprovechamiento, recuperación y/o disposición final de residuos o desechos peligrosos, requieren de

¹⁰⁶ *Ibíd.*, p. 16.

¹⁰⁷ COLOMBIA. CONGRESO DE LA REPÚBLICA. Ley 1252 (27 de noviembre, 2008)., Op. cit. p. 3.

¹⁰⁸ *Ibíd.*, p. 3.

¹⁰⁹ COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Resolución 909 (5, junio, 2008). Por la cual se establecen las normas y estándares de emisión admisibles de contaminantes a la atmósfera por fuentes fijas y se dictan otras disposiciones. [en línea]. Bogotá, 2008. Art. 93. Disponible en Internet: <http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/app/resoluciones/f0-Resoluci%C3%B3n%20909%20de%202008%20-%20Normas%20y%20estandares%20de%20emisi%C3%B3n%20Fuentes%20fijas.pdf>

¹¹⁰ COLOMBIA. SECRETARÍA DISTRITAL DE AMBIENTE. Resolución 6982 (27, diciembre, 2011). Por la cual se dictan normas sobre prevención y control de la contaminación atmosférica por fuentes fijas y protección de la calidad del aire. [en línea]. Bogotá, 2011. art. 5. Disponible en Internet: <https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?dt=S&i=45334>

¹¹¹ *Ibíd.*, art. 6.

una licencia ambiental expedida por las Corporaciones Autónomas Regionales, las de Desarrollo Sostenible, los Grandes Centros Urbanos o las autoridades ambientales creadas mediante la Ley 768 de 2002¹¹².

1.6 APROVECHAMIENTO DE ACEITES LUBRICANTES USADOS VÍA FÍSICO – QUÍMICA

A continuación, se presentan las alternativas aceptadas actualmente en Colombia para el reciclaje y la regeneración de los aceites lubricantes usados. Cabe señalar que antes de llevar a cabo cualquier tratamiento para el aprovechamiento de los mismos, es necesario realizar una serie de pretratamientos en función de los contaminantes del aceite lubricante usado a tratar, evitando así cualquier daño en los equipos del tratamiento, la perturbación del mismo y/o la emisión accidental de sustancias indeseadas al ambiente. Los pretratamientos más utilizados son: “calentamiento, sedimentación, centrifugación, demulsificación, filtración, adsorción, intercambio iónico y destilación flash”¹¹³.

1.6.1 Valorización energética. Para que los aceites lubricantes usados puedan ser aprovechados como combustible industrial en Colombia, deben satisfacer los requisitos y condiciones establecidos en la resolución 1446 del año 2005, expedida por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, en caso de no hacerlo, se deben realizar pretratamientos hasta que el aceite usado sea apto para la combustión y los gases generados por esta misma no ocasionen un impacto ambiental significativo. La valorización energética de los aceites lubricantes usados es una buena alternativa para el aprovechamiento de los mismos, pues “su capacidad calorífica específica es alta (aproximadamente 8500 kcal/kg) frente a la del carbón utilizado en Colombia (aproximadamente 6700 kcal/kg)”¹¹⁴.

En el **cuadro 22**, se presentan los porcentajes permitidos para la mezcla de los aceites lubricantes usados tratados, con otros combustibles y los límites máximos de contaminantes que estos mismos pueden poseer, según lo establece la resolución 1446 del año 2005.

Cuadro 22. Porcentajes para mezcla y límites máximos de contaminantes en aceites usados tratados.

Contaminante	Máxima concentración del contaminante (ppm)	
	Para mezcla hasta del 40%	Para mezcla hasta del 80%
Bifenilos policlorados (PCB's)	15	5

¹¹²Ibíd., p. 20.

¹¹³ MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE, Op. cit., p. 59.

¹¹⁴ NUÑEZ, María Eugenia. Aceite usado generado por motores en la ciudad de Cali. Alternativas de uso [en línea]. En: revista de Subproductos Industriales de Colombia. p. 10. Disponible en Internet: <http://www.ingenieroambiental.com/4014/motores.pdf>

Cuadro 22. (Continuación).

Contaminante	Máxima concentración del contaminante (ppm)	
	Para mezcla hasta del 40%	Para mezcla hasta del 80%
Halógenos orgánicos totales (como HCl)	650	400
Cadmio	2	1
Halógenos totales (como HCl)	800	500
Cromo	8	3
Plomo	50	10
Arsénico	2	1
Níquel	1.5	1
Zinc	120	60
Estaño	5	3
Bario	3	1
Punto mínimo de chispa (°C)	>77	>77

Fuente. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Resolución 1446, establece los casos en los cuales se permite la combustión de aceites de desecho o usados y las condiciones técnicas para realizar la misma. 2005, Bogotá, p. 2.

1.6.2 Regeneración de bases lubricantes. Consiste en recuperar la base lubricante de los aceites usados, por medio de tratamientos fisicoquímicos que favorecen la separación de los contaminantes presentes en el mismo; la base purificada es apta para la fabricación de nuevos aceites lubricantes.

Según la agencia de protección de Estados Unidos¹¹⁵, los tratamientos fisicoquímicos de regeneración o re – refinación de bases lubricantes son muy eficientes, pues por cada 3 litros de aceite usado, pueden obtenerse 2 litros de base lubricante nueva. Por otra parte, estos tratamientos deben ser realizados por un gestor de residuos peligrosos avalado, ya que estos procedimientos tienen como factor común la generación de lodos ácidos aceitosos concentrados en los contaminantes que poseía el aceite lubricante usado y una disposición inadecuada de los mismos haría inútil el tratamiento, pues ocasionaría el mismo impacto ambiental que la liberación ilegal del aceite usado no tratado. Según Florez¹¹⁶, la re – refinación de los aceites lubricantes usados se lleva a cabo en tres etapas:

1. Pre – tratamientos: por medio de operaciones unitarias básicas como la filtración, calentamiento, centrifugación, destilación flash y demulsificación, se eliminan las partículas gruesas, hidrocarburos ligeros, agua y lodos presentes en el aceite usado.

¹¹⁵ ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Managing used oil, advice for small businesses [en línea]. 1996, Estados Unidos. Disponible en: <https://archive.epa.gov/wastes/conserve/materials/usedoil/web/pdf/usedoil.pdf>. p.3.

¹¹⁶ FLOREZ PIEDRAHITA, Carlos Arturo. Transformación de los aceites usados para su utilización como energéticos en procesos de combustión. Bogotá, 2001. p. 28 – 32.

2. **Regeneración o re – refinación:** por medio de tratamientos fisicoquímicos se eliminan los metales pesados, aditivos y fangos asfálticos presentes en la matriz del aceite usado. En esta etapa se obtiene una base lubricante libre de contaminantes, pero con una fuerte coloración.
3. **Acabado:** la base lubricante obtenida puede aclararse con arcillas o tierras blanqueadoras, filtrarse y/o destilarse, dependiendo del uso que se le vaya a dar a la misma y la pureza deseada.

A continuación, se describen los procesos de regeneración o re – refinación más destacados en la actualidad.

1.6.2.1 Proceso convencional ácido – arcilla. Este proceso se lleva a cabo en cinco etapas y tiene un “rendimiento global del 70% en peso del aceite lubricante usado”¹¹⁷:

1. **Evaporación:** el aceite usado se calienta hasta 170°C, con el fin de eliminar la carga de agua y material volátil (“hidrocarburos ligeros”¹¹⁸ y “solventes orgánicos”¹¹⁹).
2. **Agitación:** el aceite “se enfría aproximadamente hasta 30°C y se mezcla con el 10% en volumen de ácido sulfúrico concentrado. Dicha mezcla se agita constantemente durante tres a cuatro horas, mientras que el ácido sulfúrico reacciona con los contaminantes presentes en el aceite usado formando sulfatos”¹²⁰.
3. **Sedimentación:** la mezcla agitada se agrega a un embudo de decantación y se deja reposar durante un día para permitir la sedimentación de los sulfatos. El lodo ácido sedimentado se extrae y se dispone según la legislación actual vigente.
4. **Estabilización del pH:** el efluente clarificado se calienta nuevamente hasta 170°C y se mezcla durante dos a cuatro horas con carbonato de sodio.
5. **Filtración:** la base lubricante obtenida se filtra por medio de tierras de Fuller o diatomácea, reteniendo así las impurezas y productos de degradación.

¹¹⁷ DELGADO, Emilio; PARRA, Jaime; AGUILAR, Luisa; GUEVARA, Daniel y NOVOA Jenny. Combustibles alternativos a partir de aceites usados con tratamientos de limpieza [en línea]. En: revista AVANCES. Investigación en Ingeniería. 2007, no. 6. p. 112. Disponible en Internet: www.unilibre.edu.co/revistaavances/avances-6/r6_art11.pdf

¹¹⁸ MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE, Op. cit., p. 63.

¹¹⁹ DELGADO, PARRA, AGUILAR, GUEVARA y NOVOA, Op. cit., p. 112.

¹²⁰ *Ibíd.*, p. 112.

1.6.2.2 Proceso BERK. Este proceso se lleva a cabo en cuatro etapas y provee una “recuperación promedio del 95% de la base lubricante, con una reducción del 75% de las cenizas presentes en el mismo”¹²¹:

- 1. Evaporación:** el aceite usado se calienta hasta 170°C, con el fin de eliminar la carga de agua y material volátil (“hidrocarburos ligeros”¹²² y “solventes orgánicos”¹²³).
- 2. Adición del solvente:** al aceite evaporado se le agrega 2-propanol-metilcetona-1-butanol, en una proporción de aceite 3:1, este solvente reacciona con los contaminantes presentes en la matriz del aceite usado.
- 3. Sedimentación:** la mezcla anterior se agrega a un embudo de decantación y se deja reposar durante 1 día para permitir la sedimentación de los contaminantes. El lodo resultante se extrae y se dispone según la legislación actual vigente.
- 4. Filtración:** el efluente clarificado se filtra por medio de tierras de Fuller o diatomácea, reteniendo así las impurezas y productos de degradación.

1.6.3.3 Proceso Kinetics Technology International. Este proceso se lleva a cabo en tres etapas y tiene como ventaja que “no genera desechos ácidos contaminantes”¹²⁴:

- 1. Destilación atmosférica:** teniendo en cuenta la diferencia de volatilidades de los contaminantes presentes en los aceites usados, se retiran los hidrocarburos ligeros, agua y aceites combustibles.
- 2. Destilación al vacío:** permite separar los compuestos asfálticos presentes en la matriz del aceite usado.
- 3. Hidrotratamiento:** el aceite purificado se hace reaccionar con hidrógeno, en presencia de un catalizador que acelera la saturación de los enlaces del aceite.

1.6.3.4 Proceso Meinken. Este proceso se lleva a cabo en cinco etapas y provee una “recuperación del 70% en peso de la base lubricante, 12% de gasoil y 7,5% de combustible pesado”¹²⁵:

¹²¹ *Ibíd.*, p. 113.

¹²² MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE, *Op. cit.*, p. 63.

¹²³ DELGADO, PARRA, AGUILAR, GUEVARA y NOVOA, *Op. cit.*, p. 113.

¹²⁴ LEAL HERRERA, Edgar Leandro y PEÑA RUIZ, Victoria Alejandra. Evaluación de tecnologías aplicadas a la recuperación de aceites gastados para el rendimiento de los motores de gasolina [en línea]. Trabajo especial de grado para optar por el título de Ingeniero Químico. Maracaibo. Universidad Rafael Urdaneta. Facultad de Ingeniería. Escuela de ingeniería química, 2009. p. 51. Disponible en Internet: <http://200.35.84.131/portal/bases/marc/texto/2101-09-02934.pdf>

¹²⁵ *Ibíd.*, p. 75.

1. **Evaporación:** el aceite usado se calienta hasta 170°C, con el fin de eliminar la carga de agua y material volátil (“hidrocarburos ligeros”¹²⁶ y “solventes orgánicos”¹²⁷).
2. **Tratamiento ácido:** El aceite es enfriado hasta 30°C y se hace reaccionar con ácido sulfúrico durante 24 horas. Posteriormente el aceite es mezclado con arcilla y calentado hasta los 270°C, en ese punto se empiezan a formar flóculos de aceite y arcilla, resultado de los procesos de oxidación y sulfatación¹²⁸.
3. **Filtración y neutralización:** el aceite ácido se filtra por medio de tierras de Fuller o diatomácea, reteniendo así las impurezas remanentes. Y es neutralizado con hidróxido de sodio. Se necesita en promedio 5% en masa de hidróxido de sodio para neutralizar el aceite tratado¹²⁹.

1.6.2.5 Extracción por solvente. Este proceso se lleva a cabo en tres etapas y provee una “recuperación global del 88% de la base lubricante”¹³⁰:

1. **Evaporación:** el aceite usado se calienta hasta 170°C, con el fin de eliminar la carga de agua y material volátil (“hidrocarburos ligeros”¹³¹ y “solventes orgánicos”¹³²).
2. **Mezcla y precipitación:** al aceite evaporado se le agrega 2-propanol, MEK o 1-butanol y se agita durante quince minutos a 300 rpm, mientras que el solvente reacciona con los contaminantes presentes en la matriz del aceite usado. La mezcla se almacena en un tanque de fondo cónico, para permitir la precipitación de las impurezas.
3. **Recuperación y destilado al vacío:** la mezcla de solvente e impurezas es llevada al horno con el fin de recuperar la mayor cantidad de solvente. Finalmente, el aceite se destila al vacío para recuperar la base lubricante y las fases combustibles.

1.7 APROVECHAMIENTO DE ACEITES LUBRICANTES USADOS VÍA BIOTECNOLÓGICA

Hasta la fecha, el aprovechamiento de los aceites lubricantes usados no ha sido muy explorado bajo un enfoque biotecnológico, debido a que la mayor parte de la investigación realizada en este campo ha estado enfocada en la biorremediación de suelos y lodos contaminados con aceites de motor usado. Con esta investigación,

¹²⁶ MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE, Op. cit., p. 63.

¹²⁷ DELGADO, PARRA, AGUILAR, GUEVARA y NOVOA, Op. cit., p. 113.

¹²⁸ AUDIBERT, Francois. Waste Engine Oils, Rerefining and energy recovery. ELSEVIER. 1 Ed. ISBN: 978-0-444-5202-3. p. 50.

¹²⁹ *Ibíd.*, p. 52.

¹³⁰ LEAL HERRERA y PEÑA RUIZ, Op. Cit., p. 124.

¹³¹ MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE, Op. cit., p. 63.

¹³² DELGADO, PARRA, AGUILAR, GUEVARA y NOVOA, Op. cit., p.113.

se busca evaluar el potencial de biotransformación y biolixiviación que aportan las bacterias reductoras de sulfatos, sobre un volumen de aceite de motor Diésel a tratar, en busca de reducir la concentración de azufre y metales pesados presentes en el mismo.

1.7.1 Bacterias reductoras de sulfatos. Son un grupo de “microorganismos procariotas pertenecientes a los dominios bacteria y archaea”¹³³, que tienen la capacidad de “usar los sulfatos, tiosulfatos, sulfuros y/o nitratos del medio, como aceptor final en su cadena de transporte de electrones”¹³⁴. Las bacterias reductoras de sulfatos tienen un rol fundamental en el planeta tierra, pues intervienen en los ciclos biogeoquímicos, transformaciones geoquímicas y en los procesos de recuperación de humedales, suelos y aguas residuales; además, “son bastante conocidas por ser causantes de la corrosión en las tuberías de hierro fundido”¹³⁵. Es posible encontrarlas en los siguientes ambientes¹³⁶:

- Océanos.
- Lagos ácidos con alta tasa de mineralización de rocas en cuencas cerradas.
- Suelos anegados (pantanos, ciénagas, humedales).
- Termales y áreas geotermales.
- Pozos petroleros y de gas.
- Emanaciones volcánicas.

1.7.1.1 Morfología. Distintos morfotipos de bacterias reductoras de sulfatos (BRS) han sido reportados en la literatura, sin embargo, los principales géneros poseen morfología de bacilo.

1.7.1.2 Sustrato. La mayoría de BRS son microorganismos quimiorganoheterotrofos, pues “su fuente de energía proviene de compuestos orgánicos de bajo peso molecular”¹³⁷, como el lactato o piruvato. También existen BRS clasificadas como quimioautolitotrofas, pues su fuente de energía es el dióxido de carbono y su fuente de electrones es el hidrógeno¹³⁸; en ambos casos, “los

¹³³ LÓPEZ GUAIMACUTO, Pedro y FUENTES, José Luis. Las bacterias sulfato – reductoras [en línea]. En: Geominas. Agosto, 2015, vol. 43, no. 67, p. 94. Disponible en Internet: https://www.researchgate.net/profile/Pedro_Lopez21/publication/309322176_Las_bacterias_sulfato-reductoras_The_sulfate-reducing_bacteria_As_bacterias_sulfato-reductoras/links/580a01f408ae45e02c0d626c/Las-bacterias-sulfato-reductoras-The-sulfate-reducing-bacteria-As-bacterias-sulfato-reductoras.pdf.

¹³⁴ D. Thierry and W. Sand, Op. cit., p. 812.

¹³⁵ S. Y. Li, Y. G. Kim; K. S. Jeon, Y. T. Kho y T. Kang. Microbiologically influenced corrosion of carbon steel exposed to anaerobic soil. Korea, 2011. p. 815–828.

¹³⁶ NUTRIENTES Y gases [Anónimo], Op. cit., p. 1.

¹³⁷ LENS, P.N.L y KUENEN, J.G. The biological sulphur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology [en línea]. En WaterSciTechnol, vol 44, p. 57. Disponible en internet: https://www.researchgate.net/publication/11626182_The_biological_sulfur_cycle_Novel_opportunities_for_environmental_biotechnology.

¹³⁸ NUTRIENTES Y gases [Anónimo]. Tercera parte. p.10. Disponible en Internet: <https://sistemamid.com/preview/nutrientes-y-gases-p3-azufre-pdf>.

aceptores finales en la cadena de transporte de electrones son los sulfatos, tiosulfatos, sulfuros y/o nitratos presentes en el medio¹³⁹.

1.7.1.3 Potencial de óxido – reducción. Las bacterias reductoras de sulfatos se consideran microorganismos anaerobios estrictos¹⁴⁰, pues su tasa de crecimiento es superior en ambientes cuyo potencial de óxido – reducción es negativo, como los “fondos oceánicos, lagos ácidos con alta tasa de mineralización de rocas en cuencas cerradas, sedimentos en forma de minerales sulfatados, pantanos, ciénagas, humedales, termales, áreas geotermales, pozos petroleros, pozos de gas y emanaciones volcánicas”¹⁴¹. El “potencial redox de los medios de cultivo que soportan el crecimiento de las BRS debe estar alrededor de los -100 mV”¹⁴².

1.7.1.4 Temperatura óptima de crecimiento. La mayoría de bacterias reductoras de sulfatos son microorganismos mesófilos¹⁴³, por lo tanto su temperatura óptima de crecimiento es 37°C. También se han reportado BRS termófilas, cuya temperatura óptima de crecimiento es 60°C.

1.7.1.5 Potencial de hidrógeno (pH). Se ha demostrado que las bacterias reductoras de sulfatos “crecen mejor dentro de un rango de pH entre 7 y 7.8”¹⁴⁴, sin embargo, estas “pueden soportar un amplio rango de pH entre 4 y 9.5”¹⁴⁵.

1.7.1.6 Presión. Las bacterias reductoras de sulfatos son microorganismos barófilos, por lo tanto, pueden soportar presiones superiores a la atmosférica. Cabe resaltar que la mayoría de BRS son encontradas en ambientes acuosos profundos, donde la presión hidrostática es moderadamente alta.

1.7.1.7 Formación de biopelículas. Las bacterias reductoras de sulfatos tienen la capacidad de construir biopelículas, en donde generalmente se llevan a cabo los procesos de reducción disimilativa de sulfatos. Según Beyenal y Lewandoski¹⁴⁶, la actividad metabólica de las BRS es máxima cuando se encuentran formando biopelículas, esto es porque aún en las partes más profundas de la misma, la disponibilidad de agua y nutrientes es suficiente, además la anaerobiosis está garantizada.

¹³⁹ D. Thierry and W. Sand, Op. cit., p. 812.

¹⁴⁰ LÓPEZ GUAIMACUTO y FUENTES, Op. cit., p. 94.

¹⁴¹ CHAMBE, Op. cit., p. 35.

¹⁴² BARTON, Op. cit., p. 26.

¹⁴³ OKABE, S, CHARAKLIS, W. G. Effects of temperature and phosphorous concentration on Microbial Sulfate Reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*. Biotechnology and Bioengineering, Ed,39, p. 1031-1042.

¹⁴⁴ VICENTE, Mariana Soledad. Uso de bacterias sulfato – reductoras inmovilizadas para la precipitación de metales pesados [en línea]. Argentina. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. 2006. p. 16. Disponible en Internet:

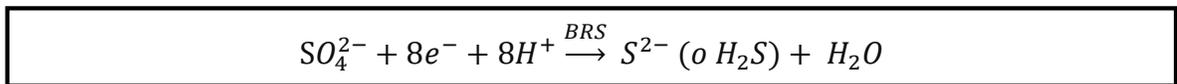
<http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2191/Documento%20completo.pdf?sequence=1>.

¹⁴⁵ BARTON, Op. cit., p. 29.

¹⁴⁶ Beyenal H., Lewandowski Z. (2004) Dynamics of lead immobilization in sulfate reducing biofilms. Water Research 38: 2726-2736.

1.7.2 Metabolismo de las bacterias reductoras de sulfatos. Por medio de su cadena de transporte de electrones, las BRS llevan a cabo la ruta metabólica de la reducción disimilativa de sulfatos, la cual les permite “sintetizar la energía necesaria para su regeneración estructural”¹⁴⁷ y duplicación; este proceso consiste en una serie de reacciones de oxidación - reducción, en donde los compuestos orgánicos de bajo peso molecular o hidrógeno presentes en el medio, se oxidan aportando los electrones requeridos para la síntesis de ATP, mientras que los sulfatos se reducen a sulfuros no incorporados a la biomasa. La **ecuación 1**, representa el proceso de reducción disimilativa de sulfatos llevado a cabo por las BRS, cabe señalar que este proceso requiere de la inversión de ocho electrones y genera agua como subproducto.

Ecuación 1. Descripción general del proceso de reducción disimilativa de sulfatos.



Fuente. BHABENDRA, Kumar Patnaik, TARANI CHARAN, Kara, SOUMENDRA, N, ABHAYA, KUMAR DELAI. Textbook of Biotechnology. S. Chand Publishing, 1993, p. 643.

A continuación, se presenta la ruta metabólica que deben seguir las BRS para llevar a cabalidad el proceso de reducción disimilativa de sulfatos.

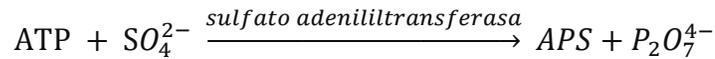
1.7.2.1 Activación de sulfatos. Constituye el primer paso en la ruta metabólica de reducción disimilativa de sulfatos, este proceso requiere de energía disponible en forma de adenosín trifosfato (ATP) que las BRS deben sintetizar. “La síntesis de ATP es posible gracias a la disminución de la energía libre de Gibbs, que se presenta cuando los electrones obtenidos por medio de la oxidación de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (fuente de carbono), se transfieren a través de las quinonas, ferredoxinas, flavodoxinas, citocromos c3 y citocromo b de la cadena de transporte de electrones”¹⁴⁸.

Una vez disponible el ATP requerido en el citoplasma, se lleva a cabo la *activación de sulfatos*, que consiste en la adición del ion sulfato (SO_4^{2-}) a un grupo fosfato del ATP, esta reacción es catalizada por la enzima sulfato adenililtransferasa y genera pirofosfato ($P_2O_7^{4-}$) y adenosina 5' – fosfosulfato (APS) como productos de reacción. La **ecuación 2**, representa el proceso de activación de sulfatos llevado a cabo en el citoplasma de las BRS.

¹⁴⁷ DREYFUS CORTÉS, Georges. Metabolismo bacteriano: El mundo de los microbios [en línea]. México, D.F: (1996). párr. 1. Disponible en Internet: http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/43/html/sec_6.html.

¹⁴⁸CHAMBE, Op. cit., p. 34.

Ecuación 2. Proceso de activación de sulfatos en el citoplasma de las BRS.

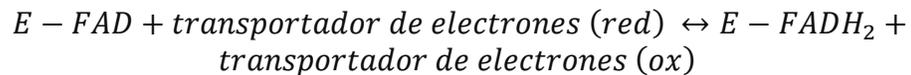


Fuente. BARTON, Larry. Sulfate - Reducing Bacteria [en línea]. Nueva York: Plenum Press, 1995. p. 17. ISBN. 978-1-4899-1584-9.

1.7.2.2 Reducción de APS. La adenosina 5' – fosfosulfato (APS) formada en la etapa anterior, se reduce a adenosín monofosfato (AMP) y sulfito (SO_3^{2-}) mediante tres etapas:

Inicialmente, la co - enzima Flavín Adenín Dinucleótido (FAD) disponible en el citoplasma de las BRS, se reduce a $FADH_2$ como se muestra en la **ecuación 3**.

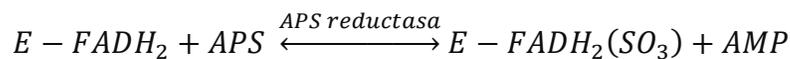
Ecuación 3. Reducción de la coenzima FAD.



Fuente. CHAMBE, Meyla. Evaluación de los métodos químicos y biogénico para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala de laboratorio. Trabajo de grado, maestría en ciencias ambientales. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2004. 91 p.

Seguidamente, el APS transfiere su grupo sulfito a la coenzima reducida ($FADH_2$), formando un aducto de sulfito ($E - FADH_2(SO_3)$). Esta reacción es catalizada por la enzima APS reductasa, como se muestra en la **ecuación 4**.

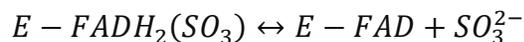
Ecuación 4. Reducción de APS a AMP.



Fuente. CHAMBE, Meyla. Evaluación de los métodos químicos y biogénico para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala de laboratorio. Trabajo de grado, maestría en ciencias ambientales. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2004. p. 91.

Finalmente, el aducto de sulfito se disocia en ion sulfito y FAD, como se muestra en la **ecuación 5**.

Ecuación 5. Disociación del aducto de sulfito.



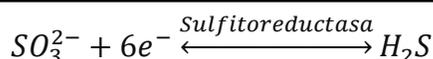
Fuente. BARTON, Larry. Sulfate - Reducing Bacteria [en línea]. Nueva York: Plenum Press, 1995. p. 17. ISBN. 978-1-4899-1584-9.

1.7.2.3 Reducción de sulfitos. El mecanismo de reducción de sulfitos llevado a cabo por las BRS no se conoce con exactitud y depende tanto del género como de

la especie que esté llevando a cabo la ruta metabólica, sin embargo “se tienen dos hipótesis”¹⁴⁹:

- *Mecanismo de reducción directa*: “la reducción de sulfitos a sulfuros es llevada a cabo en una sola etapa, la cual requiere únicamente de la presencia de la enzima sulfitoreductasa en el citoplasma y la inversión de seis electrones”¹⁵⁰ provenientes de la oxidación de la fuente de carbono. En la **ecuación 6**, se presenta el mecanismo de reducción directa de los sulfitos obtenidos a partir de APS, hasta sulfuros.

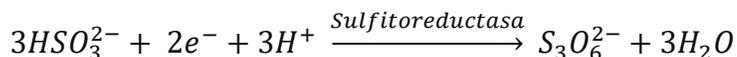
Ecuación 6. Mecanismo de la reducción directa de sulfitos.



Fuente. KUMAR PATNAIK, Bhabendra; CHARAN KARA, Tarani; NATH GHOSH, Soumendra y KUMAR DALAI, Abhaya. Textbook of Biotechnology [en línea]. Nueva Delhi: Tata McGraw Hill Education Private Limited. 2012, p. 6.42. ISBN (13) 978-0-07-107007-2, ISBN (10) 0-07-107007-9.

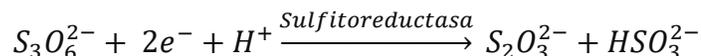
- *Ruta del tritonato*: la reducción de sulfitos a sulfuros es llevada a cabo en tres etapas que corresponden a las presentadas en las **ecuaciones 7, 8 y 9**. Cabe señalar que en esta ruta se supone la formación de dos productos intermedios: ion tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) y tritonato ($S_3O_6^{2-}$), tal como se muestra a continuación:

Ecuación 7. Reducción del ion bisulfito a tritonato.



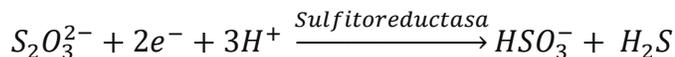
Fuente. KUMAR PATNAIK, Bhabendra; CHARAN KARA, Tarani; NATH GHOSH, Soumendra y KUMAR DALAI, Abhaya. Textbook of Biotechnology [en línea]. Nueva Delhi: Tata McGraw Hill Education Private Limited. 2012, p. 6.42. ISBN (13) 978-0-07-107007-2, ISBN (10) 0-07-107007-9.

Ecuación 8. Reducción de tritonato a ion tiosulfato.



Fuente. KUMAR PATNAIK, Bhabendra; CHARAN KARA, Tarani; NATH GHOSH, Soumendra y KUMAR DALAI, Abhaya. Textbook of Biotechnology [en línea]. Nueva Delhi: Tata McGraw Hill Education Private Limited. 2012, p. 6.42. ISBN (13) 978-0-07-107007-2, ISBN (10) 0-07-107007-9.

Ecuación 9. Reducción del ion tiosulfato a sulfuro.



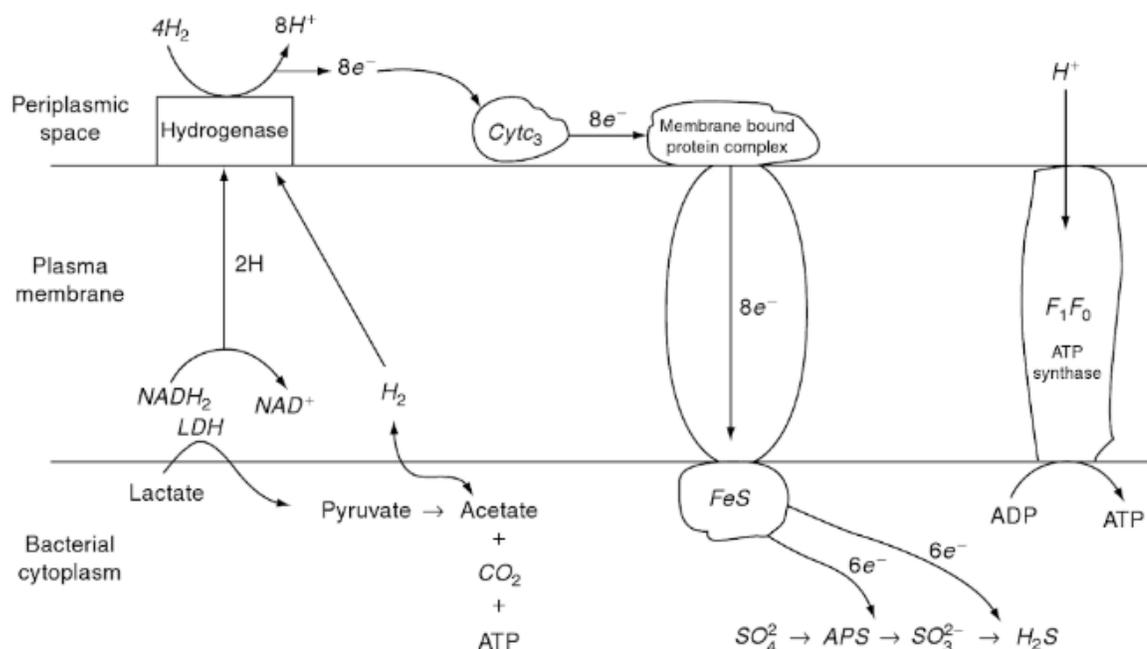
¹⁴⁹ *Ibíd.*, p. 91.

¹⁵⁰ KUMAR PATNAIK, Bhabendra; CHARAN KARA, Tarani; NATH GHOSH, Soumendra y KUMAR DALAI, Abhaya. Textbook of Biotechnology [en línea]. Nueva Delhi: Tata McGraw Hill Education Private Limited. 2012, p. 6.42. ISBN (13) 978-0-07-107007-2, ISBN (10) 0-07-107007-9.

Fuente. KUMAR PATNAIK, Bhabendra; CHARAN KARA, Tarani; NATH GHOSH, Soumendra y KUMAR DALAI, Abhaya. Textbook of Biotechnology [en línea]. Nueva Delhi: Tata McGraw Hill Education Private Limited. 2012, p. 6.42. ISBN (13) 978-0-07-107007-2, ISBN (10) 0-07-107007-9.

En la **figura 5**, se presenta un esquema que representa el acoplamiento de los procesos de síntesis de ATP y reducción disimilativa de sulfatos, llevados a cabo en la cadena de transporte de electrones.

Figura 5. Acoplamiento entre los procesos de síntesis de ATP y reducción disimilativa de sulfatos.



Fuente. Textbook of Biotechnology. Bhabendra Kumar Patnaik, Tarani Charan Kara, Soumendra Nath Ghosh, Abhaya Kumar Dalai. Pag.6.43.

1.7.3. Reacciones de transformación llevadas a cabo por las BRS.

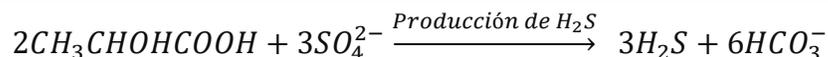
Generalmente, las bacterias reductoras de sulfatos (BRS) llevan a cabo las reacciones de oxidación - reducción descritas en la sección anterior, sin embargo, se ha descubierto que algunas especies de BRS pueden tomar otros compuestos presentes en el medio y metabolizarlos en rutas alternativas. Por otra parte, el sulfuro de hidrógeno producido por las BRS es capaz de reaccionar con compuestos potencialmente peligrosos para la salud humana y el ambiente, favoreciendo la precipitación de estos mismos. A continuación, se describen las reacciones de transformación de diferentes sustratos que pueden metabolizar ciertas especies de BRS.

1.7.3.1 Metilación de mercurio. Muchos estudios han demostrado una relación directa entre la metilación de mercurio y la presencia de bacterias reductoras de sulfatos, principalmente por parte de “los géneros *Desulfobacteraceae*,

Desulfovibrionaceae y *Desulfobulbaceae*¹⁵¹. Actualmente, estas bacterias “son consideradas las principales metiladoras de mercurio en ambientes con pequeñas cantidades de oxígeno como los ríos y lagunas del amazonas”¹⁵². El mecanismo de la metilación de mercurio no ha sido definido completamente, pues existen diversos factores que afectan el proceso: los inhibidores de crecimiento y la disponibilidad de mercurio. Uno de los pocos mecanismos que han sido identificados es el de *Desulfovibrio desulfuricans*, en donde se sabe que “el mercurio del medio es metilado gracias a la acción de la enzima hidrometiltransferasa”¹⁵³.

1.7.3.2 Formación de sulfuros metálicos. Las reacciones de transformación de metales llevadas a cabo por bacterias reductoras de sulfatos, son “las más utilizadas en los tratamientos de drenajes ácidos de mina, procesos hidrometalúrgicos y de recuperación de metales valiosos en los procesos catalíticos de cracking del petróleo”¹⁵⁴, debido a que permiten remover metales pesados con las mismas eficiencias que los tratamientos fisicoquímicos utilizados para el mismo fin. El mecanismo de reacción es intracelular, las bacterias reductoras de sulfatos llevan a cabo la ruta metabólica de la reducción disimilativa de sulfatos, liberando sulfuro de hidrógeno gaseoso, tal como se presenta en la **ecuación 10**.

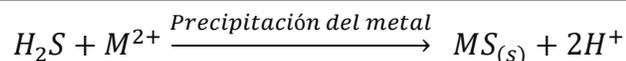
Ecuación 10. Generación de sulfuro de hidrógeno.



Fuente. CIBATI, Alessio. CHENG, Ka Yu. MORRIS, Christina. Selective precipitation of metals from synthetic spent refinery catalyst leach liquor with biogenic produced in a lactate fed anaerobic baffled reactor. En: Hydrometallurgy. Julio, 2013. Vol 139, p. 2.

El sulfuro de hidrógeno gaseoso reacciona con los metales del efluente a tratar bajo ciertas condiciones de temperatura, presión, agitación y pH, favoreciendo así la formación y precipitación de sulfuros metálicos, tal como se muestra en la **ecuación 11**.

Ecuación 11. Formación de sulfuros metálicos.



¹⁵¹ ACHÁ, Dario. HINTELMANN, Holger. YEE, Janet. Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region. En: Chemosphere. Octubre, 2010. p. 915.

¹⁵² *Ibíd.*, p. 915.

¹⁵³ SÁNCHEZ, Rita Samanta. Distribución de bacterias sulfato reductoras y metilmercurio en sedimentos de lagunas de inundación del río Beni, Amazonia Boliviana. Tesis para optar el título de magister en ciencias biológicas. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. 2005. p. 16.

¹⁵⁴ CIBATI, Alessio. CHENG, Ka Yu. MORRIS, Christina. Selective precipitation of metals from synthetic spent refinery catalyst leach liquor with biogenic produced in a lactate fed anaerobic baffled reactor. En: Hydrometallurgy. Julio, 2013. Vol 139, p.1.

Fuente. CIBATI, Alessio. CHENG, Ka Yu. MORRIS, Christina. Selective precipitation of metals from synthetic spent refinery catalyst leach liquor with biogenic produced in a lactate fed anaerobic baffled reactor. En: Hydrometallurgy. Julio, 2013. Vol. 139, 2 p.

1.7.3.3 Reducción con sulfuro de hidrógeno biogénico. Científicamente, se ha demostrado que el sulfuro de hidrógeno (H_2S) liberado como producto final del proceso de reducción disimilativa de sulfatos en las BRS, es un “fuerte agente reductor y puede ser utilizado en sistemas de detoxificación”¹⁵⁵. Se tienen evidencias de que este mismo ha sido “responsable de la reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} en efluentes de curtiembres”¹⁵⁶, de “la reducción del ion selenito (SeO_3^{2-}) a selenio elemental (S^0)”¹⁵⁷, “de la reducción de metilmercurio (CH_3Hg^+) a sulfuro de dimetilmercurio [$(CH_3Hg)_2S$]”¹⁵⁸ y “su posterior transformación a sulfuro de mercurio (HgS)”¹⁵⁹. Cabe resaltar que el Cr^{3+} y el S^0 son elementos menos tóxicos para el ser humano y el ambiente, además, la transformación de metilmercurio a sulfuro de mercurio favorece la disminución de este metal pesado en los efluentes tratados.

1.7.3.4 Reducción de Selenito y seleniato. Algunas especies del género *Desulfovibrio* tienen la capacidad de reducir los iones selenito (SeO_3^{2-}) presentes en su medio a selenio elemental (Se^0) y los iones seleniato (SeO_4^{2-}) a seleniuro de hidrógeno (H_2Se)¹⁶⁰, “en un proceso respiratorio independiente a la reducción disimilativa de sulfatos”¹⁶¹.

1.7.3.5 Reducción de hierro y uranio. Ciertos géneros de bacterias reductoras de sulfatos, tales como “*Geobacter metallireducens*, son capaces de reducir Fe^{3+} a óxido ferroso di-férrico (FeO_4) o carbonato de hierro ($FeCO_3$) y de “reducir U^{6+} a uraninita (UO_2)”¹⁶².

1.7.4 Taxonomía de las bacterias reductoras de sulfatos. La clasificación taxonómica de las bacterias reductoras de sulfatos ha venido evolucionando con la disponibilidad de la tecnología. Técnicas fenotípicas y propiedades bioquímicas

¹⁵⁵ BARTON, Op. cit., p. 17.

¹⁵⁶ SMILLIE, R.H; HUNTER, K y LOUITIT, Margaret. Reduction of chromium (VI) by bacterially produced hydrogen sulphide in a marine environment [en línea]. En: Water Research. 1981, vol 15, p. 1354. Disponible en Internet: <https://ezproxy.uamerica.edu.co:2119/science/article/abs/pii/0043135481900075>.

¹⁵⁷ BARTON, Op. cit., p. 16.

¹⁵⁸ BALDI, F; PEPI, M y FILLIPELLI, M. Methylmercury resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* strains in relation to methylmercury degradation [en línea]. En: Applied and environmental microbiology. Agosto, 1993, vol. 59. ISSN 2479-2485. Disponible en Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16349013>.

¹⁵⁹ CONRADO MORENO, Vivián; CASTILLO RODRIGUEZ, Francisco; Caballero Dominguez, Francisco Javier; ROLDÁN RUIZ, María Dolores; HUERTAS ROMERA, María José; MARTÍNEZ LUQUE, Manuel y Blasco Plá, Rafael. Biotecnología ambiental [en línea]. 2005. p. 223.

¹⁶⁰ BARTON, Op. cit., p. 17.

¹⁶¹ OREMLAND, Ronald; CULBERTSON, Charles y Winfrey, Michael. Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation [en línea]. En: Applied and Environmental Microbiology. Enero, vol 57 no. 1, p. 6, ISSN 0099-2240. Disponible en Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182673/pdf/aem00054-0152.pdf>.

¹⁶² LOVLEY, D, R. RODEN, E, E. PHILIPPS, E, J, P. and WOODWARD, J, C. 1993, Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria, Marine Geol. p. 41-53.

como la presencia de desulfovirdina han sido utilizadas para este fin¹⁶³. Con el avance en la técnica de RNA ribosomal (rRna), finalmente se clasificaron las bacterias reductoras de sulfatos en tres grandes grupos: “mesófilas Gram negativas, termófilas Gram negativas y Gram positivas”¹⁶⁴.

1.7.4.1 Mesófilas Gram negativas. Mediante el análisis de secuencia ribosomal 16S rRna, se caracterizaron las especies mesófilas Gram negativas de bacterias reductoras de sulfatos en la subclase de las Proteobacterias, además, se sugirieron dos familias de estas mismas: *Desulfovibrionaceae* y *Desulfobacteriaceae*. En la familia *Desulfovibrionaceae*, se incluyen los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*. En el **cuadro 23**, se presenta la clasificación taxonómica de las especies del género *Desulfovibrio*, su morfología y los sustratos que soportan su crecimiento. * Sustratos: Hidrógeno (H₂), Formaldehido (For), Lactato (L), Benzoato (B), Malato (M).

Cuadro 23. Clasificación taxonómica del género *Desulfovibrio*.

Taxonomía	Morfología	Desulfovirdina	Sustratos				
			H ₂	For	L	M	B
<i>Desulfuricans</i>	Vibrio	+	+	+	+	+	-
<i>Longus</i>	bacilo	+	+	-	+	-	-
<i>Termitidis</i>	Bacilo ovalado	+	-	+	-	-	-
<i>Simplex</i>	Vibrio	+	+	+	+	-	-
<i>Giganteus</i>	Vibrio/bacilo	+	+	-	+	-	-

Fuente. BARTON, Larry. Sulfate - Reducing Bacteria [en línea]. Nueva York: Plenum Press, 1995. p. 55. ISBN. 978-1-4899-1584-9.

1.7.4.2 Termófilas Gram negativas. Los géneros pertenecientes a esta clase de BRS han sido objeto de estudio reciente, debido a su gran aplicabilidad en procesos hidrometalúrgicos y de desulfuración de gases¹⁶⁵. Normalmente, estas bacterias son aisladas de fuentes termales o de sistemas volcánicos y “son muy útiles en la industria”¹⁶⁶, pues su supervivencia en ambientes extremos de temperatura facilita su aplicación a los bioprocesos. Los géneros *Thermodesulfobacterium* y *Thermodesulfovibrio* abarcan la mayoría de especies de BRS termófilas Gram negativas encontradas hasta el momento. “Dos de las especies más estudiadas de

¹⁶³ SÁNCHEZ, Rita Samanta, Op. cit., p.17.

¹⁶⁴ FOTI, Mirjam. SOROKIN, Dmitry. LOMANS, Bart. Diversity, activity, and abundance of sulfate reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. En: Applied and Environmental Microbiology. Abril, 2007. Vol 7. p. 2093.

¹⁶⁵ CABRERA REVUELTA, Gema. Estudio de procesos para la solubilización y precipitación de iones metálicos contaminantes mediante bacterias azufre oxidantes y sulfato reductoras. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias. Trabajo para optar por el título de PhD en Ingeniería Química. Mayo, 2005. p. 54.

¹⁶⁶ KAKSONEN, Anna. PLUMB, Jason. ROBERTSON, Wendy. Novel thermophilic Sulfate reducing bacteria from geothermally active underground mine in Japan. En: Applied and Environmental Microbiology. Mayo, 2006. Vol 72, p. 3659-3760.

esta clase son *T. commune* y *T. mobilis*, juntas aisladas del parque Yellowstone en Estados Unidos¹⁶⁷.

1.7.4.3 Gram positivas. Esta clase de bacterias reductoras de sulfatos es liderada por el género *Desulfotomaculum*. Al iniciar los estudios con estas especies, se encontró inesperadamente que poseían pared celular, en contraste con lo que se buscaba en los estudios (ausencia de pared celular), este hallazgo dio inicio al análisis filogenético que vendría años después y al “descubrimiento de varias especies como: *Dm Acetoxidans*, *Dm Guttoideum*, entre otras¹⁶⁸. En el **cuadro 24**, se presentan las especies correspondientes al género *Desulfotomaculum*, su morfología, rangos óptimos de temperatura y principales donadores de electrones. * Sustratos: Hidrógeno (H₂), Formaldehído (For), Lactato (L), Benzoato (B), Malato (M).

Cuadro 24. Clasificación taxonómica del género *Desulfotomaculum*.

Taxonomía	Morfología	Rango de temperaturas óptima (°C)	Donadores de electrones				
			H ₂	For	L	E	B
<i>Antarticum</i>	Bacilo	34-36	-	-	-	+	-
<i>Guttoideum</i>	Bacilo	40	+	-	+	-	-
<i>Nigrificans</i>	Bacilo	55	+	+	+	+	+
<i>Orientis</i>	Bacilo curvado	42	+	+	+	-	-
<i>Ruminis</i>	Bacilo	37	-	+	+	-	-

Fuente. BARTON, Larry. Sulfate - Reducing Bacteria [en línea]. Nueva York: Plenum Press, 1995. p. 60. ISBN. 978-1-4899-1584-9.

¹⁶⁷ BARTON, Op. cit., p. 60.

¹⁶⁸ BARTON, Op. cit., p. 60.

2. MÉTODOS

En este capítulo se describirán las técnicas físicas, químicas y microbiológicas utilizadas para llevar a cabo el tratamiento biológico de contacto directo del aceite lubricante usado de motor Diésel con cepas nativas de bacterias reductoras de sulfatos; así mismo, se presentarán las técnicas empleadas por los laboratorios externos para la caracterización de las muestras de ALU y la identificación bacteriana.

2.1 TÉCNICAS FÍSICAS.

Corresponde a las técnicas utilizadas durante el desarrollo experimental, para la adecuación de las muestras de ALU al tratamiento biológico y para la caracterización de los elementos químicos presentes en las mismas.

2.1.1 Filtración al vacío. También conocida como filtración por succión, es una técnica utilizada para separar los contaminantes sólidos de mayor tamaño presentes en la matriz de ALU. Se fundamenta en una separación sólido – líquido que requiere de un medio filtrante y una bomba de vacío que retira el aire presente en el recipiente de filtración, generando así una presión diferencial que succiona rápidamente el líquido a separar.

2.1.2 Evaporación. Es una técnica utilizada para retirar la carga de agua y material volátil presente en las muestras de ALU después del tratamiento biológico. Consiste en aumentar la temperatura del aceite usado tratado hasta 130°C y mantenerla constante durante 25 minutos.

2.1.3 Caracterización del aceite lubricante usado. Se contrató con el laboratorio SGS Colombia, para caracterizar las muestras de ALU antes y después del tratamiento biológico. A continuación, se presentan los ensayos realizados por dicho laboratorio.

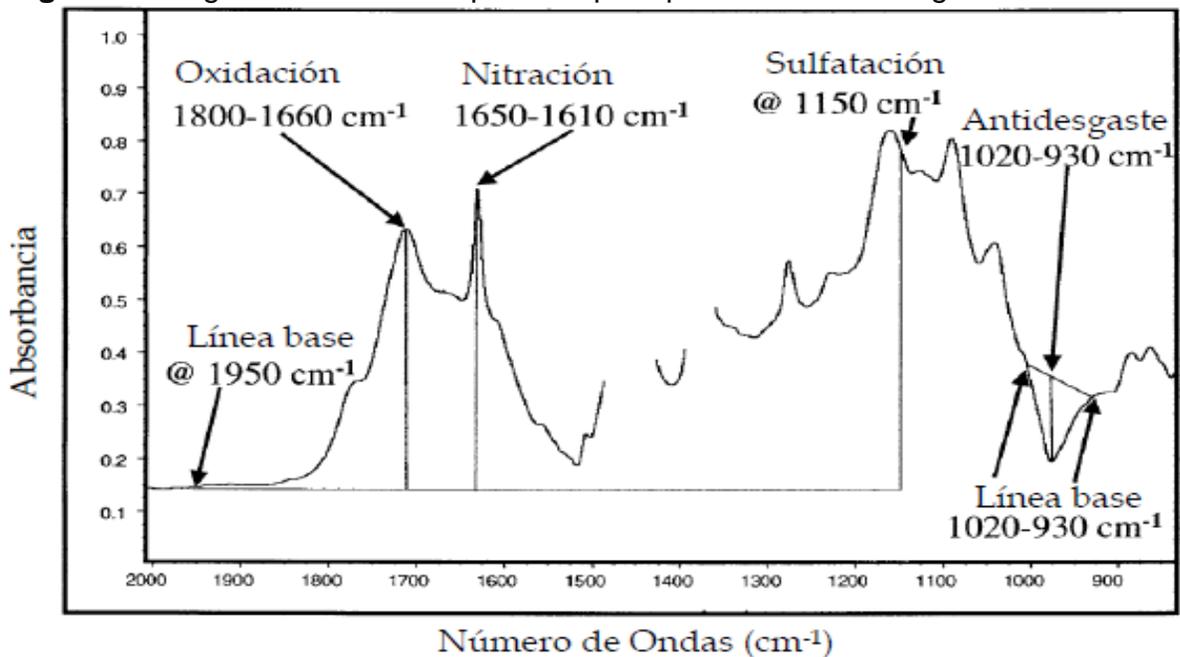
2.1.3.1 Viscosidad. Medida a 100°C según la ASTM D7279. El procedimiento se realizó en un viscosímetro de Houllion. El cual cuenta con un baño termostático para subir gradualmente la temperatura de la muestra y una columna de viscosidad con sensores ópticos, los cuales se encargan de enviar las señales al ordenador y reportar los resultados¹⁶⁹. Los resultados se reportan en centistokes (cSt).

2.1.3.2 Análisis infrarrojo. La espectrofotometría infrarroja por Transformadas de Fourier, consiste en disponer la muestra en una celda de espectrofotometría, donde es sometida a luz infrarroja de un rango de longitudes de entre 930-1950 cm⁻¹, con lo cual, se obtiene un interferograma, en unidades de voltaje. Finalmente, es

¹⁶⁹ OMNITEK. Automatic Houllion: Kinematic viscometry system for petroleum products [En línea]. Waddinxvenn. 2017. Disponible en: https://www.parkesscientific.com/wpcontent/uploads/2016/02/Sflow_brochure_V1.2_1.pdf.

necesario utilizar la Transformada de Fourier para convertirlo en un espectro y obtener unidades de absorbancia¹⁷⁰ como las que se presentan en la **figura 6**. Se utilizó para determinar los parámetros de oxidación, nitración, hollín, sulfatación, porcentaje de glicol y porcentaje de combustible en la matriz del aceite lubricante usado antes y después del tratamiento, se realizó según la norma ASTM E 2412 y los resultados se reportaron en A/0,1mm.

Figura 6. Longitudes de onda esperadas para parámetros de desgaste en los ALU.



Fuente. GÓMEZ, Yesid. Contribución al desarrollo y mejora para cuantificación de la degradación de aceites lubricantes. p.30.

2.1.3.3 Espectrometría. Se realizó según la norma ASTM D6595¹⁷¹ “ Los metales de desgaste y contaminantes en los ALU son excitados por un arco de descarga controlado usando la técnica de disco rotatorio. La energía generada en forma de radiación es seleccionada analíticamente por tubos múltiples de fotones y detectores. Luego el sistema compara el patrón obtenido con la curva de calibración para determinar la concentración de los elementos.” Esta técnica se utilizó para determinar la concentración de los metales presentes en la matriz del aceite lubricante usado antes y después del tratamiento: Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Molibdeno (Mo), Fósforo (P), Zinc (Zn), Boro (B), Silicio (S), Sodio (Na), Aluminio (Al), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Plomo (Pb), Manganeso (Mn), Níquel (Ni),

¹⁷⁰ MKS. Technical note: Introduction to FTIR Spectroscopy [En línea]. Newport. 2015. Disponible en: <https://www.newport.com/b/mks-instruments>.

¹⁷¹ STANDARD TEST METHOD. Determination of wear metals and contaminants in used lubricating oils or used hydraulic fluids by rotating disc electrode atomic emission spectrometry. Designación: D6595-17. Mayo, 2017. DOI: 10.1520/D6595-17.

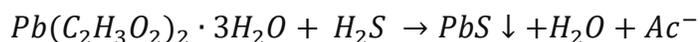
Plata (Ag), Estaño (Sn), Titanio (Ti), Vanadio (V) y Bario (Ba), los resultados se reportaron en partes por millón (ppm).

2.2 TÉCNICAS QUÍMICAS.

Corresponde al grupo de técnicas utilizadas para determinar, la producción de ácido sulfhídrico, por parte del inóculo. Además de pruebas de calidad del aceite como lo son el número total ácido (TAN) y el número total básico (TBN)

2.2.1 Prueba de determinación cualitativa de sulfuro de hidrógeno. Es una técnica útil para “la detección de cantidades ínfimas de sulfuro de hidrógeno”¹⁷² en estado gaseoso. Se fundamenta en la formación de un precipitado negro de sulfuro de plomo, que verifica el contacto entre el sulfuro de hidrógeno presente en el medio y el acetato de plomo añadido como reactivo, tal como se muestra en la **ecuación 12**. Por otra parte, la presencia de sulfuro de hidrógeno en estado gaseoso puede comprobarse de manera organoléptica, pues en el medio se percibe un “fuerte olor a huevos podridos”¹⁷³.

Ecuación 12. Fundamento de la prueba de detección cualitativa de sulfuro de hidrógeno.



Fuente. MACFADDIN. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3 Ed, Montevideo, Uruguay. 2003. p.194.

2.2.2 Número total ácido (TAN). Se realizó según la norma ASTM D664¹⁷⁴, “La muestra de ALU, es disuelta con tolueno, y se realiza una titulación potenciométrica con hidróxido de potasio, utilizando un electrodo de vidrio de referencia, para obtener curvas de voltaje contra volumen. Por medio de métodos de cálculo, se logra obtener el volumen necesario para oxidar un gramo de muestra”. El fin de determinar el número total de acidez del aceite lubricante usado antes y después del tratamiento biológico, los resultados se reportaron en mgKOH/g.

2.2.3 Número total básico (TBN). Se realizó según la norma ASTM D2896¹⁷⁵, “La muestra es disuelta en una solución de ácido acético y clorobenceno y es titulado con una solución de ácido perclórico usando un titulador potenciómetro.” Este análisis se realizó con el fin de determinar el número total de basicidad del aceite

¹⁷² MACFADDIN. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3 Ed, Montevideo, Uruguay. 2003. p. 194.

¹⁷³ AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES. Resúmenes de Salud Pública – Ácido sulfhídrico (Hydrogen Sulfide) [en Línea]. Atlanta. (6 de mayo de 2016), parágrafo.1.1. Disponible en Internet: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs114.html.

¹⁷⁴ STANDARD TEST METHOD. Acid Number of petroleum products by potentiometric titration. Julio, 2018. DOI: 10.1520/D0664-18E02.

¹⁷⁵ STANDARD TEST METHOD. Base number of petroleum products by potentiometric perchloric acid titration. Mayo, 2017. DOI: 10.1520/D2896-15.

lubricante usado antes y después del tratamiento biológico, los resultados se reportaron en mgKOH/g.

2.3 TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

Corresponde a las técnicas utilizadas durante el desarrollo experimental para el tratamiento e identificación de microorganismos.

2.3.1 Muestreo. En la Norma Técnica Colombiana NTC - ISO 5667-2¹⁷⁶, “Gestión ambiental. Calidad del agua. Técnicas generales de muestreo”, se describen los lineamientos para la recolección de muestras microbiológicas; se recomienda que dichas muestras sean tomadas en recipientes de vidrio o plástico esterilizados de máximo 300 mL de capacidad. Para realizar el muestreo en lagos o aguas estancadas, el recipiente de muestra debe sumergirse por completo y sellarse en profundidad, evitando así la entrada de oxígeno. Finalmente, las muestras deben mantenerse bajo refrigeración durante su transporte al laboratorio.

Se precisa además la realización de un informe que contenga la localización y detalles del sitio de muestreo, fecha de recolección, nombre del recolector, condiciones climáticas y otras descripciones de importancia de la muestra.

2.3.2 Esterilización. Es una técnica utilizada para desactivar los microorganismos presentes en los instrumentos de laboratorio o reactivos de trabajo. Consiste en la exposición de los materiales y reactivos de trabajo, a vapor saturado que alcanza una temperatura de 121°C y 1 atm de presión, durante 20 minutos. Dichas condiciones son proporcionadas por el equipo autoclave descrito en el **anexo G**.

2.3.3 Siembra por extensión en superficie. Es una técnica utilizada para la obtención masiva de colonias bacterianas. Consiste en extender el inóculo sobre la superficie del medio de cultivo selectivo solidificado; este procedimiento debe realizarse bajo condiciones de asepsia y esterilidad, evitando así la contaminación del cultivo con microorganismos distintos a los de estudio.

2.3.4 Tinción de Gram. Es una técnica de coloración diferencial “desarrollada en la década de 1880, por el médico Danés Hans Christian Joachim Gram”¹⁷⁷. Consiste en la adición ordenada y cronometrada de ciertos colorantes de contraste, reactivos de fijación y decoloración, con el fin de clasificar las bacterias en dos grandes grupos dependiendo de la ausencia o presencia de pared celular: Gram negativas y Gram positivas, respectivamente.

¹⁷⁶ INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Gestión ambiental: Calidad del agua. Muestreo. Técnicas generales de muestreo. NTC-ISO 5667-2. Bogotá D.C 1995.

¹⁷⁷ RODRÍGUEZ, Patricia y ARENAS, Roberto. Hans Christian Gram y su tinción [en línea]. En: Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. 2018, vol. 16, no. 2, p. 166. Disponible en Internet: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>.

2.3.5 Aislamiento bacteriano. Es una técnica utilizada para obtener cultivos bacterianos puros. Consiste en la extracción e inoculación en nuevo medio de cultivo, de una colonia bacteriana presente en un cultivo mixto de microorganismos.

2.3.6 Identificación molecular de bacterias. Permite determinar la filogenia de una cepa bacteriana aislada. Consiste en obtener la secuencia purificada del gen 16S rRNA de la cepa en estudio y compararla con las secuencias presentes en diferentes bases de datos taxonómicas, las cuales, por similitud, le asociarán a la muestra problema un género y especie existentes.

2.3.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es una técnica de biología molecular que permite “generar una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN”¹⁷⁸, para posteriormente secuenciarlo y usarlo en la identificación de microorganismos. Fue “desarrollada en el año 1983 por el bioquímico estadounidense Kary Banks Mullis”¹⁷⁹ y consta de tres fases¹⁸⁰:

1. Desnaturalización: las cadenas de ADN se separan a temperaturas superiores a 90°C.

2. Hibridación: los cebadores se unen por complementariedad al ADN molde, esta reacción ocurre a temperaturas entre 35 - 60°C.

3. Elongación o extensión: la enzima polimerasa añade nucleótidos complementarios, a partir del extremo 3' libre de la región hibridada por los cebadores.

2.3.6.2 Método de Sanger. También conocido como método didesoxi o secuenciación por terminación de la cadena, fue desarrollado “en el año 1977 por el bioquímico británico Frederick Sanger y permite determinar la secuencia del ADN molde a medida que se sintetiza su hebra complementaria”¹⁸¹. Este método requiere de cuatro didesoxirribonucleótidos trifosfato para impedir la adición de nuevos nucleótidos por parte de la enzima ADN polimerasa. “Mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, cada fragmento de ADN generado se separa de acuerdo a su tamaño”¹⁸² y se obtiene un patrón de bandas del cual se puede deducir la secuencia de ADN.

¹⁷⁸ PÉREZ DE CASTRO, Ana María. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) [en línea]. RiuNet repositorio UPV. Valencia. (11 de abril de 2011), p. 1. Disponible en Internet: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>.

¹⁷⁹ *Ibíd.*, p. 2.

¹⁸⁰ *Ibíd.*, p. 3.

¹⁸¹ UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO. Secuenciación del ADN [en línea]. ehu. España. p. 1. Disponible en Internet: http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/bioinf/pdf/tema_2a.pdf.

¹⁸² *Ibíd.*, p. 1.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se describirán los procedimientos y referentes bibliográficos que permitieron llevar a cabo el tratamiento biológico de los aceites lubricantes usados de motor Diésel (ALU) proporcionados por el CTT. Además, se presentará el diseño experimental planteado para el mismo y la metodología que condujo a obtener los valores de la variable respuesta.

3.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para seleccionar el área termal en donde se recolectaron las muestras, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros fisicoquímicos:

- **Temperatura del agua termal:** entre 30°C – 70°C, debido a que en estos ambientes se encuentran las bacterias reductoras de sulfatos (BRS) de interés: mesófilas Gram negativas y termófilas Gram negativas.
- **Localización:** generalmente se encuentran BRS en “manantiales termales cercanos a sedimentos con alta tasa de mineralización, ricos en pirita, sulfuro ferroso y/o dimetilsulfuro”¹⁸³.
- **Potencial de hidrógeno (pH):** cercano a la neutralidad, facilitando así el tratamiento de las muestras en el laboratorio.
- **Caudal del manantial termal:** bajo, pues hay mayor probabilidad de encontrar bacterias reductoras de sulfatos en aguas estancadas.
- **Fuerte olor a sulfuro de hidrógeno:** indica la presencia de BRS que generan sulfuro de hidrógeno como metabolito.

3.1.1 Recolección de agua termal. Se realizó el 3 de diciembre del año 2017, teniendo en cuenta las recomendaciones de la NTC – ISO 5667-2, descritas en el parágrafo 2.3.1. Cinco muestras de agua termal con un volumen de 50 mL fueron recolectadas de diversas profundidades en los frascos para muestras con tapón descritos en el **ANEXO F**.

3.1.2 Recolección de lodo termal. Se realizó el 3 de diciembre del año 2017, teniendo en cuenta las recomendaciones de la NTC – ISO 5667-2, descritas en el parágrafo 2.3.1. Una muestra de 300 gramos de lodo termal perteneciente a los alrededores del nacimiento del manantial, fue recolectada en los frascos para muestras con tapón descritos en el **ANEXO F**.

Las muestras recolectadas fueron puestas inmediatamente bajo refrigeración, en una nevera de Icopor que contenía 5 bolsas de gel refrigerante y se mantuvieron allí durante su transporte al laboratorio de biotecnología y nanotecnología de las instalaciones del Tecnoparque Nodo Bogotá.

¹⁸³ NUTRIENTES Y gases [Anónimo], Op. cit., p. 1-2.

3.2 AISLAMIENTO BACTERIANO

Con el fin de obtener los microorganismos aptos para el tratamiento biológico de los ALU, se procedió a cultivar las cepas presentes en las muestras recolectadas de agua y lodo termal. El aislamiento bacteriano se llevó a cabo en seis etapas: aumento selectivo de la carga bacteriana, siembra por extensión en superficie, caracterización macro y microscópica de las colonias obtenidas una vez transcurrido el tiempo de incubación, selección de los microorganismos aptos para el tratamiento biológico e inoculación de estos mismos en nuevo medio de cultivo (aumento poblacional).

3.2.1 Aumento selectivo de la carga bacteriana. A través de los años, se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de BRS. Según Ismail, Yahaya y Abu Bakar¹⁸⁴, el medio de cultivo Postgate C presenta mayor crecimiento de bacterias reductoras de sulfatos, respecto a otros medios de cultivo ampliamente utilizados como el Baar's y Postgate B. Además, según Barton¹⁸⁵, la formulación del medio de cultivo Postgate C tiene numerosas aplicaciones, "los metales presentes en el medio de cultivo actúan como cofactores para varias enzimas, el níquel y el selenio son necesarios para la actividad de la hidrogenasa y el hierro es un elemento esencial para la producción de los citocromos"¹⁸⁶ que soportan la cadena de transporte de electrones. Teniendo en cuenta las conclusiones de Ismail, Yahaya, Abu Bakar y Barton, se decidió utilizar el medio de cultivo Postgate C para el crecimiento y duplicación de las BRS presentes en las muestras recolectadas de agua y lodo termal, además, a este mismo se le añadió L-cisteína como agente reductor¹⁸⁷, facilitando así la disminución del potencial de óxido – reducción dentro del medio de cultivo. En la **tabla 2**, se presenta la formulación del medio de cultivo utilizado durante la experimentación.

Tabla 2. Formulación del medio de cultivo utilizado durante la experimentación.

Compuesto	Concentración (g/L)
Lactato de sodio	7.66 mL
Sulfato de sodio	4.5
Sulfato de magnesio	0.06
Cloruro de amonio	1
Extracto de levadura	1

¹⁸⁴ ISMAIL, Mardhiah. YAHAYA, Nordin. ABU BAKAR, Akrima. Cultivation of sulfate reducing bacteria in different media. Malaysian Journal of Civil Engineering. Disponible en: Research Gate [en línea]. 2014. p. 464.

¹⁸⁵ BARTON, Op. cit., p. 63.

¹⁸⁶ Sadana, J.C y Rittenberg, D. Iron requirement for the hidrogenase of *Desulfovibrio desulfuricans*. En: Biochemistry, biophysics. 1964. vol. 108. p. 255 – 257.

¹⁸⁷ TOERIEN, D. THIEL, P. HATTINGH, M. Enumeration, insolation and identification of sulphate reducing bacteria of anaerobic digestion. National Institute for Water Research. Disponible en Science Direct [en línea]. 2 vol, 1968, p. 508.

Tabla 2. (Continuación).

Compuesto	Concentración (g/L)
Fosfato mono potásico	0.5
Citrato de sodio di- hidratado	0.3
Cloruro de calcio hexa - hidratado	0.06
Sulfato de hierro	0.004
L- cisteína	0.5

Fuente. TOERIEN, D. THIEL, P. HATTINGH, M. Enumeration, isolation and identification of sulphate reducing bacteria of anaerobic digestion. National Institute for Water Research. Disponible en Science Direct [en línea]. 2 vol, 1968, p. 508.

Para el aumento selectivo de la población de bacterias reductoras de sulfatos, se procedió a preparar 300 mL de medio de cultivo Postgate C, tal como se presenta en el **anexo A**.

Manteniendo las condiciones de asepsia y esterilidad en la cabina de flujo laminar vertical, se añadió el volumen de cada muestra recolectada en 6 frascos tapa rosca azul de 200 mL, seguido de 50 mL del medio de cultivo preparado anteriormente y se nombraron alfabéticamente desde la letra A hasta la letra F, siendo la muestra B la que contenía el lodo termal.

Según lo expuesto en el parágrafo 1.7.1.3, las BRS son microorganismos anaerobios estrictos y de acuerdo con la temperatura del mesotermal en donde se recolectaron las muestras ($\approx 32^{\circ}\text{C}$), se determinó empíricamente que los microorganismos presentes en estas mismas son de carácter mesófilo. En ese orden de ideas, se procede a añadir una capa de 60 mL de aceite mineral a cada frasco tapa rosca azul inoculado, suministrando así la atmósfera anaerobia requerida por las BRS, los frascos se sellan perfectamente y se ingresan a la incubadora de agitación precisa, la cual se encargará de mantener la temperatura en 37°C (temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos mesófilos) y la agitación en 150 rpm durante 15 días, tal como lo propuso Qiang Li, *Et al*, en el artículo “ Isolation of *Thiobacillus spp* and it´s application in the removal of heavy metals from activated sludge”¹⁸⁸. En la **tabla 3**, se presentan las condiciones de incubación requeridas para el crecimiento y duplicación de las BRS en medio líquido.

¹⁸⁸ LI, Qiang. WANG, Cong. *et al*. Isolation of *Thiobacillus spp* and it´s application in the removal of heavy metals from activated sludge. Key laboratory of molecular microbiology and technology for ministry of education. Nankai University. 29, noviembre, 2012. ISSN: 1684-5315. p.2.

Tabla 3. Condiciones de incubación de las BRS en medio líquido.

Variable	Valor
Tiempo (días)	15
Temperatura (°C)	37
Agitación (rpm)	150

Fuente. Elaboración propia basada en fuentes bibliográficas.

En la **imagen 1**, se presenta el montaje utilizado para el enriquecimiento de la muestra de lodo termal, cabe señalar que la mezcla de lodo y medio de cultivo "Postgate C" ocupan el volumen desde 0 hasta 100 mL y el volumen restante (hasta 170 mL) corresponde al aceite mineral utilizado para generar la atmosfera anaerobia.

Imagen 1. Enriquecimiento de la muestra de lodo termal.



Fuente. Elaboración propia.

3.2.2 Siembra por extensión en superficie. Una vez finalizado el tiempo de enriquecimiento de las muestras de agua y lodo termal, fue necesario obtener cultivos mixtos de los microorganismos presentes en dichas muestras, consiguiendo así colonias diferenciadas que puedan extraerse según el *procedimiento de aislamiento bacteriano*. Con este propósito, se prepararon 60 mL de medio de cultivo Postgate C, tal como se presenta en el **ANEXO A** y se le adicionó agar granulado como agente solidificante en una concentración de 20 g/L¹⁸⁹, esta solución se llevó a la plancha de calentamiento y agitación magnética, la cual se mantuvo a 70°C y 300 rpm, durante el tiempo de disolución de las sales y del agar

¹⁸⁹ ATLAS, Ronald. Handbook of microbiological media. 4 ed. Washington D.C, CRC press, 2010. 1409 p.

granulado en el medio de cultivo. La solución obtenida se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

Cuando la solución esterilizada disminuyó su temperatura hasta $\approx 40^{\circ}\text{C}$ (“el agar gelifica alrededor de 40°C , dependiendo de su grado de pureza”¹⁹⁰) y manteniendo las condiciones de asepsia y esterilidad en la cabina de flujo laminar vertical, se procedió a servir 10 mL de dicha solución en cada placa de Petri (6) y se esperó su solidificación. El procedimiento mencionado se presenta a detalle en el **Anexo B**.

A continuación, se llevó a cabo el procedimiento de siembra por extensión en superficie de las muestras enriquecidas. Manteniendo las condiciones de asepsia y esterilidad en la cabina de flujo laminar vertical, se inocularon 0.1 mL de las muestras enriquecidas anteriormente, sobre las placas de Petri servidas, el inóculo se extendió con la ayuda del asa de Drigalsky e inmediatamente se cerró la placa de Petri, evitando así la contaminación de la muestra. Finalmente, las cajas de Petri sembradas por extensión en superficie se organizaron en la jarra de anaerobiosis, con un sobre de anaerobiosis que aseguró la eliminación del oxígeno presente en la jarra, la cual se introdujo a la incubadora estándar que mantuvo la temperatura en 37°C (temperatura óptima de crecimiento para bacterias mesófilas), durante 30 días. En el **ANEXO C** y en la **imagen 2**, se detalla e ilustra respectivamente, el procedimiento de siembra por extensión en superficie de las muestras de agua y lodo termal enriquecidas, llevado a cabo en las instalaciones del laboratorio de biotecnología y nanotecnología de la red tecnoparque nodo Bogotá.

Imagen 2. Siembra por extensión en superficie de las muestras de agua y lodo termal enriquecidas.



Fuente. Elaboración propia.

3.2.3 Caracterización macroscópica. Se realizó una descripción de las colonias obtenidas una vez transcurrido el tiempo de incubación de las muestras sembradas

¹⁹⁰ UNIVERSIDAD DE GRANADA. Preparación de medios de cultivo [en línea]. España. 2 p. Disponible en Internet: <https://www.ugr.es/~cjl/medios%20de%20cultivo.pdf>

por extensión en superficie. Dicha descripción incluyó forma, tamaño, color, elevación y consistencia de cada colonia.

3.2.4 Caracterización microscópica. De acuerdo con la técnica de tinción de Gram, cuyo fundamento se presenta en el parágrafo 2.3.4, se describió la morfología de las bacterias que conformaron las colonias obtenidas una vez transcurrido el tiempo de incubación de las muestras sembradas por extensión en superficie. El procedimiento de caracterización microscópica se llevó a cabo en tres etapas: extendido y fijado de colonias, coloración de Gram y observación microscópica.

3.2.4.1 Extendido y fijado de colonias. A partir del cultivo mixto bacteriano obtenido en cada placa de Petri (6) después del tiempo de incubación de las muestras sembradas por extensión en superficie, se seleccionaron las colonias de mayor tamaño y numeración en la placa, pues se infiere que los microorganismos que las componen son los que mejor toleran las condiciones suministradas y de esta manera se aumenta la probabilidad de aislar bacterias reductoras de sulfatos. Con la ayuda de un asa bacteriológica esterilizada previamente en el bactoincinerador y manteniendo las condiciones de asepsia y esterilidad en la cabina de flujo laminar vertical, se extrajeron las colonias seleccionadas en cada una de las placas de Petri y se extendieron respectivamente sobre un portaobjeto con la ayuda de dos gotas de agua. Finalmente, cada colonia extendida se fijó utilizando calor suministrado por la llama del mechero de alcohol. En el **anexo D**, se detalla el procedimiento descrito anteriormente.

3.2.4.2 Tinción de Gram. Es una técnica de coloración diferencial que permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos, dependiendo de la ausencia o presencia de pared celular: Gram negativas y Gram positivas, respectivamente. Inicialmente, sobre cada portaobjetos fijado se añadió el colorante catiónico cristal violeta durante un minuto: todas las bacterias se tiñen y pierden la selectividad de membrana. Posteriormente y durante un minuto, se realizó un tratamiento de yodo con Lugol de Gram, el cual actuó como fijador mordiente reforzando el enlace entre el cristal violeta y el peptidoglicano, los ácidos teicoicos y lipoteicoicos presentes en la pared celular bacteriana.

Enseguida se realizó una decoloración con alcohol - acetona durante 30 segundos, este reactivo es insoluble en el complejo yodo/cristal violeta; así que si después de este paso el enlace entre peptidoglicanos, ácidos teicoicos, lipoteicoicos y cristal violeta fue:

Fuerte: se clasificó la bacteria como Gram positiva y continuó de color morado.

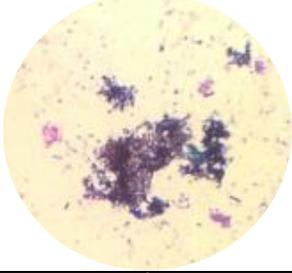
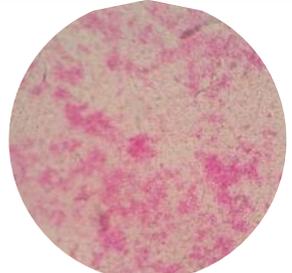
Débil: se clasificó la bacteria como Gram negativa y se decoloró.

Finalmente, se realizó una coloración de contraste que permitió evidenciar las bacterias Gram negativas, las cuales se tiñeron de color fucsia debido a la adición

del colorante Fucsina durante un minuto. El procedimiento detallado se presenta en el **ANEXO D**.

3.2.4.3 Observación microscópica. Los resultados de la tinción de Gram se observaron utilizando el microscopio óptico vertical, con un aumento de 100X proporcionado por el lente objetivo, se seleccionó este aumento pues las bacterias reductoras de sulfatos poseen un potencial de óxido – reducción (Eh) negativo, lo cual las hace lentas metabólicamente y el tiempo de crecimiento suministrado antes de su observación microscópica es muy corto para observar bacterias de tamaño grande. En el **cuadro 25**, se presentan los criterios descritos por Hans Christian Gram para la clasificación morfológica de las bacterias observadas en el microscopio óptico vertical.

Cuadro 25. Clasificación morfológica de las bacterias según Hans Christian Gram.

Clasificación	Imagen	Descripción
Gram positivas		Reaccionan positivamente a la tinción de Gram y se observan de color morado en el microscopio óptico. Se caracterizan por la presencia de pared celular.
Gram negativas		Reaccionan negativamente a la tinción de Gram y se observan de color fucsina en el microscopio óptico. Se caracterizan por la ausencia de pared celular.

Fuente. Elaboración propia.

3.2.5 Selección de los microorganismos aptos para el tratamiento biológico.

Los criterios de selección de los microorganismos a utilizar en el tratamiento biológico de los ALU, fueron acordes con los antecedentes bibliográficos que señalan que las BRS clasificadas morfológicamente como bacilos Gram negativos anaerobios, llevan a cabo de manera estricta la ruta metabólica de reducción disimilativa de sulfatos descrita en el parágrafo 1.7.2, lo cual garantiza la formación de sulfuro de hidrógeno como metabolito primario, que es responsable de la precipitación de metales en los tratamientos actuales de drenajes ácidos de minas y que en el tratamiento biológico de los ALU, sería capaz de reaccionar con los metales pesados facilitando su remoción. A continuación, se presentan los criterios que facilitaron la selección de los microorganismos aptos para el tratamiento biológico:

- Microorganismos: bacterias.
- Morfología: bacilos.
- Reacción a la coloración de Gram: negativa.
- Clasificación por temperatura: mesófilas o termófilas.
- Medio de cultivo: Postgate C.
- Producción de metabolitos: sulfuro de hidrogeno (H₂S).
- Potencial redox (Eh): negativo, crecimiento bajo condiciones de anaerobiosis estricta o facultativa.

3.2.6 Purificación bacteriana. Una vez seleccionadas las colonias que satisfacen los requerimientos mencionados en el párrafo anterior, se procede a aislarlas de los cultivos mixtos. Manteniendo las condiciones de asepsia y esterilidad en la cabina de flujo laminar vertical, se tomaron los cultivos mixtos (placas de Petri sembradas por extensión en superficie con los inóculos de muestra enriquecidos) en los que se encontraban las colonias seleccionadas como aptas para el tratamiento biológico de los ALU y con la ayuda de un asa bacteriológica se extrajeron y se adicionaron por separado en frascos tapa rosca azul de 500 mL que contenían 250 mL de medio de cultivo Postgate C, seguidamente, a cada frasco se le adicionaron 200 mL de aceite mineral, proporcionando así la atmósfera anaerobia requerida por las BRS. Los frascos tapa rosca azul se sellaron perfectamente y se introdujeron a la incubadora de agitación precisa, la cual se encargó de mantener la temperatura en 37°C y la agitación en 150 rpm durante 30 días. El crecimiento de las bacterias aisladas en medio líquido se verificó de manera organoléptica, pues el aumento poblacional bacteriano se evidenció por un aumento en la turbidez del caldo de cultivo y un fuerte olor a sulfuro de hidrógeno. En la **tabla 4**, se presentan las condiciones de incubación requeridas para el crecimiento y duplicación de las bacterias aisladas en medio líquido.

Tabla 4. Condiciones de incubación de las colonias aisladas.

Variable	Valor
Tiempo (días)	30
Temperatura (°C)	37
Agitación (rpm)	150

Fuente. Elaboración propia.

Para verificar que las cepas seleccionadas como aptas para el tratamiento biológico de los ALU, efectivamente produjeran el gas de sulfuro de hidrógeno, se llevó a cabo la prueba de detección cualitativa de ácido sulfhídrico, cuyo fundamento se describió en el párrafo 2.2.1. Una vez transcurrido el tiempo de incubación y con la ayuda de un taladro, se perforaron las tapas de los frascos tapa rosca azul de 500 mL que contenían las cepas aisladas. En cada hueco se acopló una manguera industrial de ¼" de diámetro y 19 cm de longitud, a estas mangueras se les había adaptado previamente un tubo de ensayo con rosca de igual diámetro que la

manguera en uno de sus extremos y contenía una tirilla de papel filtro de celulosa impregnado con una solución de acetato de plomo al 10% v/v.

Según el manual de prácticas de laboratorio de inocuidad alimentaria de la Universidad Autónoma del Estado de México¹⁹¹, el recipiente de reacción debe mantenerse en un lugar oscuro para que la reacción entre el acetato de plomo y el sulfuro de hidrógeno gaseoso se lleve a cabo correctamente. Teniendo en cuenta lo anterior, se forraron los tubos de ensayo (recipientes de reacción) con papel kraft y los montajes completos se introdujeron en la incubadora de agitación precisa a 37°C y 150 rpm durante 24 horas, lo cual aseguró que las bacterias aisladas continuaran con la producción de metabolitos. Este procedimiento se detalla en el **ANEXO E** y se ilustra en la **imagen 3**.

Imagen 3. Montaje de la prueba de detección cualitativa de ácido sulfhídrico.



Fuente. Elaboración propia.

Para la interpretación de los resultados de esta prueba se definieron las siguientes afirmaciones, según lo descrito en el manual de prácticas de laboratorio de inocuidad alimentaria de la Universidad Autónoma del Estado de México¹⁹²:

- Si los tubos de ensayo y/o el papel de filtro de celulosa no presentan coloración alguna, no hubo producción de ácido sulfhídrico gaseoso por parte de las bacterias aisladas.

¹⁹¹ UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO. Manual de prácticas de laboratorio inocuidad alimentaria [en línea]. México 7 p. Facultad de Medicina. Disponible en Internet: http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_971_MP%20Inocuidad%20Alimentaria.pdf

¹⁹² *Ibíd.*, p. 7.

- Si los tubos de ensayo y/o el papel de filtro de celulosa adquieren un color pardo tenue, la reacción se considera ligeramente positiva y el gas producido por las bacterias aisladas es una mezcla que contiene ácido sulfhídrico.
- Si los tubos de ensayo y/o el papel de filtro de celulosa toman un color negro, la reacción es positiva y el gas producido por las bacterias aisladas es ácido sulfhídrico.

3.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS.

Con el fin de determinar la filogenia de las cepas bacterianas aisladas, se contrató con el laboratorio CorpoGen, en donde se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Aislamiento y purificación del ADN bacteriano.
2. Amplificación del gen ribosomal 16S mediante la técnica de PCR, descrita en el párrafo 2.3.6.1.
3. Purificación de los fragmentos de PCR y secuenciación, mediante el método de Sanger, descrito en el párrafo 2.3.6.2 y utilizando los iniciadores 337F, 518F, 800R, y 1100R del gen ribosomal 16S.
4. Limpieza y ensamblaje de las secuencias para obtener la secuencia problema.
5. Análisis taxonómico de la secuencia problema mediante la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), comparando contra la base de datos RNA de referencia "refseq_rna".
6. Análisis taxonómico de la secuencia problema mediante las herramientas "Classifier" y "SeqMatch", alojadas en el sitio Web de RDP (*Ribosomal Data Project*). La primera herramienta se usa para determinar la taxonomía de la secuencia problema; la segunda herramienta se utiliza para identificar las secuencias más similares, en la base datos de RDP, con la secuencia problema. Ambas realizan la comparación usando la base de datos "16S rRNA training set 16" propia de RDP.
7. Alineamiento múltiple, usando el algoritmo MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*), de la secuencia problema con las treinta secuencias de mayor similitud reportadas por BLAST.
8. Generación de un árbol filogenético usando el modelo de distancia genética de *Tamura-Nei* (TN93), con el método de "*NeighborJoining*" y el método de "*Bootstrap*" con mil réplicas.
9. Clasificación taxonómica de la secuencia consenso.

3.4 TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE ACEITES LUBRICANTES USADOS DE MOTOR DIÉSEL

Como se ha mencionado anteriormente, el fundamento de esta investigación consistió en extraer el mecanismo biotecnológico que aportan las BRS, a los tratamientos biológicos de precipitación de sulfuros metálicos en aguas de drenajes ácidos de mina, con el fin de proponer una alternativa microbiológica a nivel de

laboratorio, que permita remover el azufre y los metales pesados adquiridos en la matriz del aceite lubricante, como consecuencia de la oxidación y desgaste que se presenta dentro del motor durante su vida útil. En esta sección, se expone el tratamiento biológico planteado por los investigadores para el tratamiento de los ALU generados por el CTT, así como el diseño de experimentos que se siguió con el fin de evaluar cuantitativamente la remoción de los contaminantes ya mencionados.

3.4.1 Diseño de experimentos. Una vez aisladas las cepas bacterianas aptas para el tratamiento biológico en cuestión, se planteó un diseño de experimentos factorial de orden 2², siguiendo la metodología propuesta por Gutiérrez Pulido y Vara Salazar¹⁹³.

3.4.1.1 Objetivo experimental. Evaluar cuantitativamente la disminución de azufre y metales pesados, en las muestras de aceite lubricante usado de motor Diésel tratadas microbiológicamente.

3.4.1.2 Variables respuesta. La disminución de metales pesados en el aceite lubricante usado tratado biológicamente, se evaluó calculando el *porcentaje de remoción* de los metales hierro, molibdeno, fósforo, zinc, silicio, sodio, aluminio y cobre, dicha información fue proporcionada por caracterizaciones fisicoquímicas que se les realizaron a las muestras de aceite lubricante antes y después del tratamiento biológico y su método de cálculo se presenta en el **Diagrama 1**. La disminución de azufre en el aceite lubricante usado tratado, se evaluó por medio del parámetro *sulfatación*, suministrado por las caracterizaciones fisicoquímicas que se les realizaron a las muestras de aceite lubricante antes y después del tratamiento biológico.

3.4.1.3 Factores de estudio. Los factores analizados en el tratamiento biológico propuesto, fueron las cepas bacterianas aisladas clasificadas como aptas para la experimentación (cepas B y D).

3.4.1.4 Niveles de estudio. Los niveles corresponden a los valores en los que varían los factores de estudio. Para el tratamiento biológico de los aceites lubricantes usados, se decidió variar el porcentaje de inóculo en cada experimento en 50% inóculo-50% ALU y 75% inóculo-25% ALU, respectivamente. En la **tabla 5**, se presentan los niveles seleccionados para cada factor del diseño.

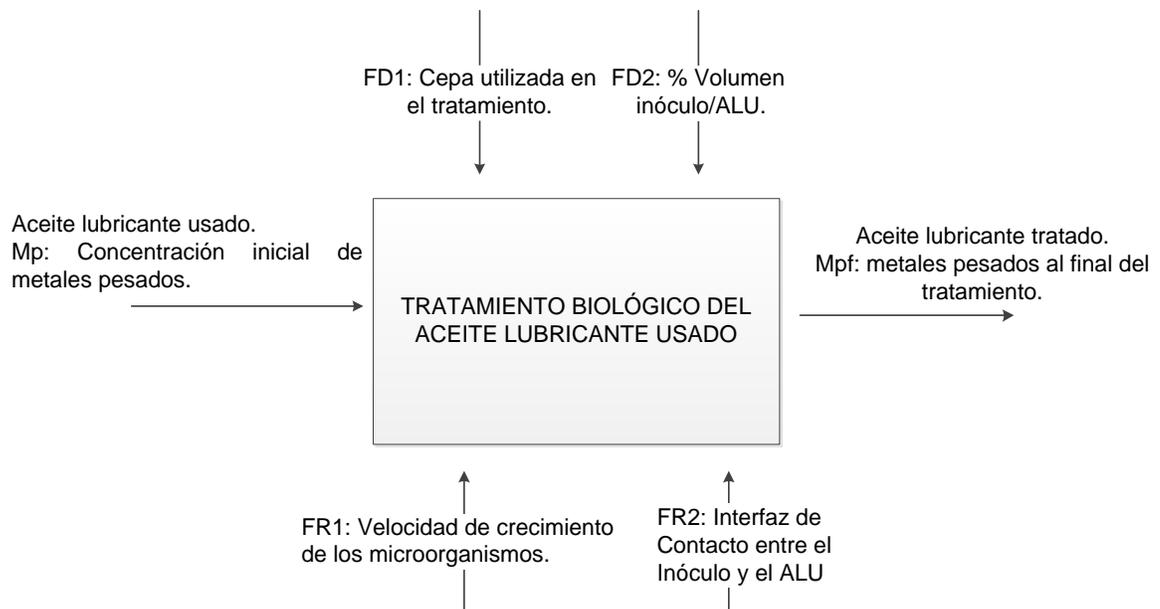
Tabla 5. Niveles por factor de diseño

Cepa	% Inóculo/Total
B	50
D	75

¹⁹³ GUTIÉRREZ, PULIDO, Humberto. SALAZAR, Román de la Vara. Análisis y diseño de experimentos. 2 Ed, McGrawHill, México. p. 10. ISBN-10: 970-10-6526-3.

3.4.1.5 Diseño experimental. Teniendo en cuenta los factores y niveles de estudio seleccionados para el desarrollo experimental en el párrafo anterior, se trabajó con un diseño de experimentos factorial de orden 2^2 , con una réplica de cada experimento, lo cual resulta en el montaje de ocho experimentos. En el **diagrama 1** se presenta el esquema del diseño de experimentos implementado, en donde los datos de entrada son el aceite lubricante usado (ALU) y las variables de diseño o de estudio, se denominaron como FD1 y FD2. Los factores de ruido que se tuvieron en cuenta fueron la velocidad de crecimiento del microorganismo y el área de contacto entre el ALU y el inóculo. Las variables de salida evaluadas en el estudio, fueron los porcentajes de variación de la concentración final de elementos metálicos, no metálicos y metaloides, presentes en el ALU tratado con las bacterias.

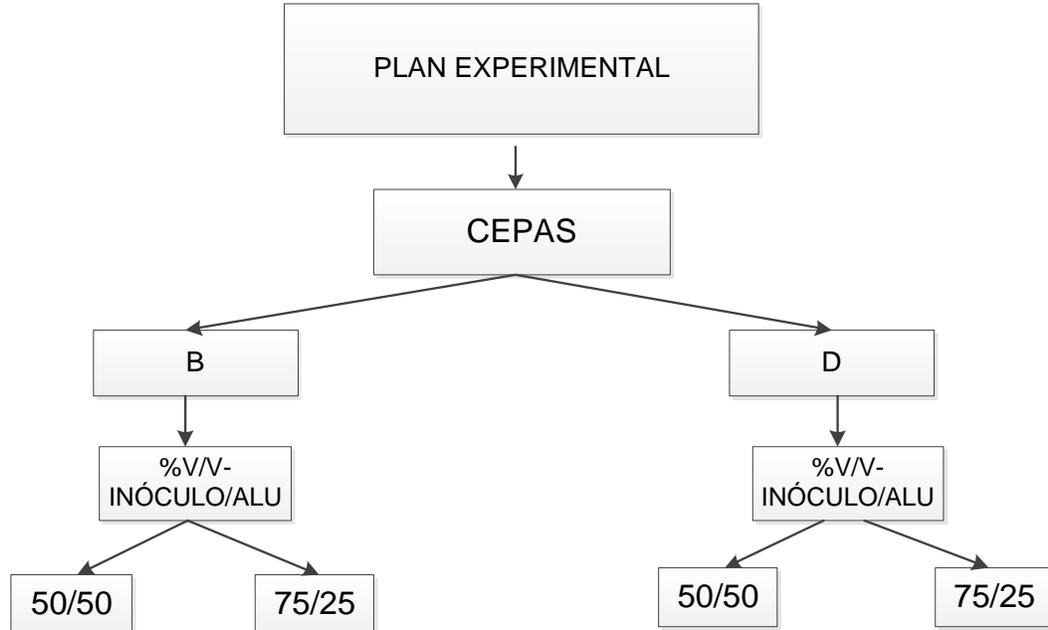
Diagrama 1. Esquema del diseño de experimentos.



Fuente. Elaboración propia.

En el **diagrama 2**, se presenta el plan experimental que se siguió en la investigación. Con cada una de las cepas aisladas se realizó un total de 4 experimentos, variando entre los volúmenes de 50% inóculo-50% ALU, y 75% ALU-25% inóculo. Cada uno de estos experimentos contó con una réplica, para un total de 8 tratamientos.

Diagrama 2. Plan experimental sin réplicas.



Fuente. Elaboración propia.

3.4.2 Pretratamiento del aceite lubricante usado. En la presente investigación se evalúan muestras de un aceite multigrado usado de motor Diésel, de referencia Mobil Delvac MX 15W – 40.

Según TORMOS¹⁹⁴, los ALU poseen concentraciones de impurezas exteriores, como arena y tierra, que ingresan al sistema de lubricación y son los contaminantes de mayor diámetro de partícula que poseen estos aceites. Antes del tratamiento biológico de las muestras de ALU, es preciso eliminar dichas impurezas, pues se han definido como factores de inhibición del proceso de remoción de azufre y metales pesados, debido a que microscópicamente interrumpen el contacto bacteria – metal pesado, al ocupar los sitios activos de la membrana externa celular.

Teniendo en cuenta lo anterior, se filtraron 3 L de ALU suministrado por el CTT, eliminando así las “impurezas con diámetros de partícula superior a 5 mm”¹⁹⁵ presentes en su matriz. Para este procedimiento, se utilizó la técnica de filtración al vacío descrita en el parágrafo 2.2.1. En la **imagen 4**, se presenta el montaje para la filtración al vacío de los ALU.

¹⁹⁴ TORMOS, Op. cit., p. 38.

¹⁹⁵ MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Manual técnico para el manejo de aceites lubricantes usados. Bogotá, 2006. ISBN 958-97878-8-6.

Imagen 4. Montaje para la filtración al vacío de las muestras de ALU.



Fuente. Elaboración propia.

Por otra parte, es probable que las muestras de ALU proporcionadas por el CTT presenten contaminación microbiana, pues estas mismas han estado expuestas a la atmósfera y pudieron haberse contaminado con esporas típicas de la contaminación ambiental. Además, el agua es el contaminante más común de un aceite lubricante usado de motor Diésel, lo que favorece la activación de las esporas y por tanto el crecimiento bacteriano en el mismo. En razón de lo expuesto, fue necesario asegurarse de que en el tratamiento biológico no interfiriera la presencia de otro tipo de microorganismos diferentes a los de estudio, por lo que se esterilizó en autoclave los 3 L de aceite previamente filtrado, según la metodología presentada en el párrafo 2.3.2.

3.4.3 Tratamiento biológico de los aceites lubricantes usados. A continuación, se describe el tratamiento biológico de los ALU llevado a cabo por los investigadores a nivel de laboratorio. El experimento consistió en un procedimiento de tipo Batch, en donde se colocaron en contacto directo las muestras de aceite lubricante usado de motor Diésel pre tratadas, con el inóculo de bacterias seleccionadas como aptas para el tratamiento.

El montaje del experimento se realizó en la cabina de flujo laminar vertical, asegurando así las condiciones de asepsia y esterilidad. Inicialmente, se preparó y esterilizó en autoclave 2.5 L de medio de cultivo Postgate C, tal como se presenta en el **ANEXO A**. Seguidamente, se tomaron ocho matraces de Erlenmeyer con tapón perforado, a los cuales se les acopló una manguera de 1cm de diámetro y 19 cm de longitud, tapada en uno de sus extremos con plastilina, esto con el fin de realizar el control cualitativo semanal de la producción de ácido sulfhídrico por parte de las bacterias.

Con ayuda de la probeta graduada y la micropipeta de volumen variable de 100 – 1000 μ L, se añadieron los reactivos del tratamiento biológico en las proporciones

que se presentan en el **cuadro 26**. Los experimentos se mantuvieron durante 29 días en la incubadora de agitación precisa a 37°C y 150 rpm. Cabe señalar que la atmósfera anaerobia requerida por las bacterias inoculadas, fue proporcionada por las mismas muestras de ALU.

Cuadro 26. Proporciones de los reactivos utilizados en el tratamiento biológico de los ALU.

Proporción (Inóculo/ALU)	25%	50%	75%
Medio de cultivo (mL)	101.25	202.5	303.75
Inóculo (mL)	11.25	22.5	33.75
ALU (mL)	337.5	225	112.5
Total (mL)	450	450	450

Fuente. Elaboración propia.

En la **imagen 5**, se ilustra el montaje del experimento llevado a cabo al 50%Inóculo/50% ALU.

Imagen 5. Montaje del tratamiento biológico de los aceites lubricantes usados.



Fuente. Elaboración propia.

3.4.4 Adecuación del aceite lubricante usado tratado biológicamente. Una vez finalizado el tratamiento biológico de los ALU y con la ayuda del embudo de decantación, se separaron las fases caldo bacteriano – ALU tratado. Posteriormente, el ALU tratado se filtró al vacío para separar las células remanentes en su matriz y se evaporó a 130 °C para eliminar la carga de agua y material volátil, pues la presencia de estos contaminantes interfiere en los ensayos de

espectrometría e infrarrojo requeridos para la caracterización fisicoquímica de los ALU.

3.5 EVALUACIÓN CUALITATIVA DEL TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE LOS ALU.

La evaluación cualitativa de la remoción de azufre y metales pesados se llevó a cabo semanalmente durante el tiempo de experimentación, verificando los parámetros turbidez del inóculo y presencia de precipitado.

3.5.1 Turbidez del inóculo. Se evaluó mediante inspección visual en los matraces de experimentación, debido a que la precipitación constante de sulfuros metálicos en el caldo bacteriano no permitía realizar un análisis espectrofotométrico. Se tuvo en cuenta la siguiente escala cualitativa: 1- No se evidencia turbidez, 2- Baja turbidez, 3 – Turbidez media, 4- Turbidez alta, 5- Turbidez superior.

3.5.2 Presencia de precipitado. Se evaluó mediante inspección visual en los matraces de experimentación, teniendo en cuenta la siguiente escala cualitativa: 1- Muy poco precipitado, 2- Poco precipitado, 3- Cantidad media de precipitado, 4- Bastante precipitado, 5- Cantidad superior de precipitado.

3.6 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE LOS ALU.

Al finalizar el tratamiento biológico, se acondicionaron las 8 muestras resultantes, según las técnicas presentadas en el párrafo 3.4.4. Para su posterior envío al laboratorio SGS Colombia donde se realizaron los análisis de viscosidad, análisis infrarrojo, espectrometría, TAN y TBN, presentados en el párrafo 2.1.3.

Los resultados se compararon con la norma NTC-5995, “Petróleo y sus derivados. Bases lubricantes re – refinadas”. Se tomaron los elementos referenciados en la norma y se compararon con los resultados obtenidos para así determinar si era posible re-utilizar el ALU como base lubricante, cumpliendo los estándares requeridos.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este capítulo se presentará el análisis de los resultados obtenidos al aplicar los métodos y procedimientos descritos en los capítulos anteriores, con el fin de evaluar cualitativa y cuantitativamente la disminución de azufre y metales pesados en los ALU tratados biológicamente, según el diseño experimental planteado por los investigadores.

4.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Teniendo en cuenta los parámetros fisicoquímicos mencionados en el numeral 3.1 para la selección del área termal, así como el inventario de fuentes termales del departamento de Cundinamarca. Se llevó a cabo la recolección de las muestras en el mesotermal “Casablanca”, localizado en el municipio de Ricaurte, Cundinamarca (930760 E, 963287 N), tal como se presenta en la **figura 7**.

Figura 7. Localización del mesotermal Casablanca.



Fuente. COLOMBIA, MINISTERIO DE MINAS Y ENERGÍA. Instituto de investigación e información geocientífica. Inventario de fuentes termales del departamento de Cundinamarca. Bogotá D.C. agosto, 2003.

En el **cuadro 27**, se presentan los parámetros fisicoquímicos que incidieron en la selección del manantial “Casablanca” como lugar de muestreo. Cabe resaltar que, al llegar al nacimiento del manantial seleccionado se evidencia un fuerte olor a sulfuro de hidrógeno y el caudal de agua choca con rocas mineralizadas. Según el inventario de fuentes termales del departamento de Cundinamarca¹⁹⁶, el mesotermal Casablanca “emerge entre depósitos de coluvión y yace sobre potentes

¹⁹⁶ COLOMBIA, MINISTERIO DE MINAS Y ENERGÍA. Instituto de investigación e información geocientífica. Inventario de fuentes termales del departamento de Cundinamarca. Bogotá D.C. p. 58. agosto, 2003.

capas de areniscas finas y cuarzosas de color rojizo”, además, según la Organización Latinoamericana De Energía¹⁹⁷, las rocas sedimentarias que circundan con el termal Casablanca son ricas en pirita. En la **imagen 6**, se presentan los sitios del mesotermal “Casablanca” seleccionados para el muestreo.

Cuadro 27. Propiedades fisicoquímicas del manantial Casablanca.

Altitud (msnm)	pH	Dureza (mg CaCO ₃ /L)	T (°C)	Caudal máximo (l/s)	Olor a H ₂ S
294	6.66	365.9	31.8	11.8 l/s	Fuerte

Fuente. COLOMBIA, MINISTERIO DE MINAS Y ENERGIA. Instituto de investigación e información geocientífica. Inventario de fuentes termales del departamento de Cundinamarca. Bogotá D.C. p. 63. agosto, 2003.

Imagen 6. Sitios del mesotermal “Casablanca” seleccionados para el muestreo.



Fuente. Elaboración propia.

4.1.1 Recolección de agua termal. Se recolectaron cinco muestras de agua termal provenientes de un perfil profundo, de coloración grisácea y fuerte olor a sulfuro de hidrógeno. Se nombraron en orden alfabético desde la letra A hasta la letra F, exceptuando la letra B, que corresponde a la muestra de lodo termal.

4.1.2 Recolección de lodo termal. Se recolectó una muestra de 300 g de lodo termal de coloración gris oscura y aspecto viscoso; cabe señalar que, pasados dos días, esta muestra poseía un olor a ácido sulfhídrico más fuerte que las muestras de agua termal recolectadas. Se nombró con la letra B.

¹⁹⁷ OLADE. Organización Latinoamericana de Energía, ICEL, geotérmica italiana S.R.L AND CONTECOL. 1982. Estudio de reconocimiento de los recursos Geotérmicos de la República de Colombia. p. 455.

4.2 AISLAMIENTO BACTERIANO

Siguiendo la metodología propuesta en el numeral 3.2 para la selección y aislamiento de los microorganismos aptos para el tratamiento biológico, se obtuvieron los resultados que se presentan a continuación.

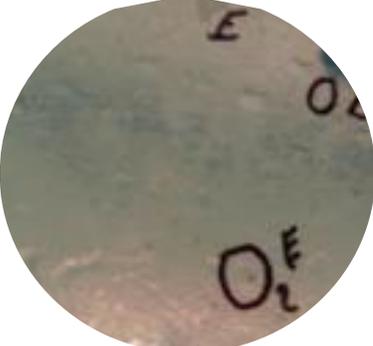
4.2.1 Aumento selectivo de la carga bacteriana. Pasados los 15 días de incubación y enriquecimiento de las muestras recolectadas de agua y lodo termal, se evidencia un ennegrecimiento de las mismas, la formación de un precipitado negro y el olor a sulfuro de hidrógeno se hizo más fuerte. Lo anterior se interpreta a favor del aislamiento bacteriano, pues el aumento del olor a sulfuro de hidrógeno es un indicador de la presencia y duplicación de la población de BRS mesófilas, que llevan a cabo la ruta metabólica de reducción disimilativa de sulfatos y producen ácido sulfhídrico como metabolito primario. Por otra parte, el ennegrecimiento de las muestras está relacionado con la producción de sulfuro de hidrógeno, pues teniendo en cuenta que el mesotermal “Casablanca” circunda con rocas sedimentarias ricas en pirita, se infiere que las muestras recolectadas poseen altas concentraciones de hierro que pueden precipitarse como sulfuros de hierro cuando entran en contacto con el sulfuro de hidrógeno biogénico, tal como lo reporta CIBATI, CHENG y MORRIS en la **ecuación 11**, donde se puede interpretar M^{2+} como el hierro presente en las muestras con estado de oxidación 2^+ . Cabe señalar que la presencia de sulfuro de hierro en el agua se evidencia por un ennegrecimiento de esta misma y la formación de un precipitado de coloración negra, tal como se evidencia en la imagen 1.

4.2.2 Caracterización macroscópica. A continuación, se presenta la descripción macroscópica de las colonias que lograron aislarse de los cultivos mixtos, una vez transcurridos los 30 días de incubación. En esta caracterización se incluye forma, tamaño, color, elevación y consistencia de las colonias aisladas, además, se incluye el ítem “observación” que indica la muestra de agua o lodo termal de la que provienen dichas colonias. Cabe señalar que las colonias aisladas se nombraron en orden alfabético desde la letra A hasta la letra I.

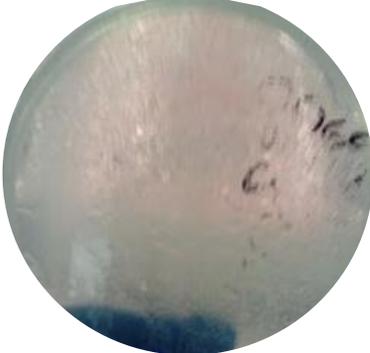
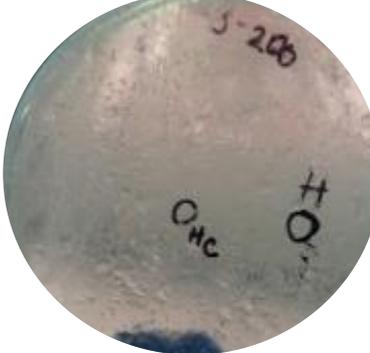
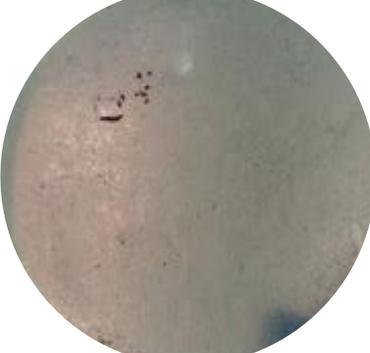
Cuadro 28. Caracterización macroscópica de las colonias aisladas.

Muestra	Imagen	Descripción
A	 A circular petri dish containing a bacterial culture. The surface is covered with a dense, dark, and somewhat irregular growth, characteristic of bacterial colonies. There are some faint markings on the surface, possibly from a marker or the growth itself.	Forma: colonias redondeadas. Tamaño: grande. Color: marfil opaco. Elevación: convexa. Consistencia: viscosa. Observación: proveniente de la muestra de agua termal “A”

Cuadro 28. (Continuación).

Muestra	Imagen	Descripción
B		<p>Forma: colonias redondeadas, muy bien definidas. Tamaño: pequeño. Color: marfil opaco. Elevación: convexa. Consistencia: viscosa. Observación: proveniente de la muestra de lodo termal "B".</p>
C		<p>Forma: colonias redondeadas, muy bien definidas. Tamaño: pequeño, algunas de tamaño mediano. Color: marfil opaco. Elevación: convexa. Consistencia: viscosa. Observación: proveniente de la muestra de agua termal "A".</p>
D		<p>Forma: amorfas. Color: marfil opaco claro. Elevación: sin elevación. Consistencia: viscosa. Observación: proveniente de la muestra de lodo termal "B".</p>
E		<p>Forma: colonias redondeadas, muy bien definidas. Tamaño: medianas. Color: marfil opaco. Elevación: convexa Consistencia: viscosa. Observación: proveniente de la muestra de agua termal "C".</p>

Cuadro 28. (Continuación).

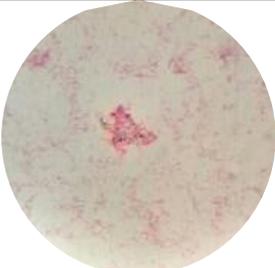
Muestra	Imagen	Descripción
F		<p>Forma: colonias redondeadas, muy definidas.</p> <p>Tamaño: pequeño.</p> <p>Color: marfil opaco claro.</p> <p>Elevación: convexa.</p> <p>Consistencia: viscosa.</p> <p>Observación: proveniente de la muestra de agua termal "F".</p>
G		<p>Forma: colonias redondeadas.</p> <p>Tamaño: pequeño.</p> <p>Color: marfil opaco claro.</p> <p>Elevación: convexa.</p> <p>Consistencia: viscosa.</p> <p>Observación: proveniente de la muestra de agua termal "E".</p>
H		<p>Forma: colonias redondeadas, muy bien definidas.</p> <p>Tamaño: mediano.</p> <p>Color: marfil opaco.</p> <p>Elevación: convexa</p> <p>Consistencia: viscosa.</p> <p>Observación: proveniente de la muestra de agua termal "E".</p>
I		<p>Forma: colonias redondeadas, muy bien definidas.</p> <p>Tamaño: mediano.</p> <p>Color: marfil opaco claro.</p> <p>Elevación: convexa</p> <p>Consistencia: viscosa.</p> <p>Observación: proveniente de la muestra de agua termal "F".</p>

Fuente. Elaboración propia.

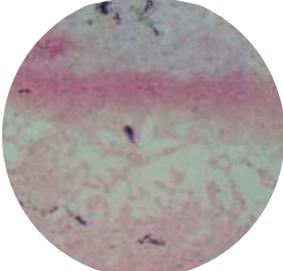
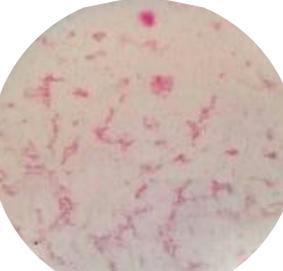
De la caracterización macroscópica presentada en el **cuadro 28**, se concluye que hubo crecimiento bacteriano por parte de todas las muestras de agua y lodo termal recolectadas (muestras A, B, C, D, E, F), se resalta además que los microorganismos crecieron bajo las condiciones requeridas por las BRS, sin embargo, al haberse proporcionado un ambiente óptimo para el crecimiento de microorganismos mesófilos, es muy probable que se hayan aislado microorganismos con morfologías diferentes a las esperadas, por lo que para la selección de los microorganismos aptos para el tratamiento biológico de los ALU, se hizo necesario caracterizar microscópicamente las colonias aisladas.

4.2.3 Caracterización microscópica. En el **cuadro 29**, se presenta la caracterización microscópica de las colonias que lograron aislarse de los seis cultivos mixtos, una vez transcurridos los 30 días de incubación. Esta caracterización se llevó a cabo siguiendo las técnicas de coloración de Gram y observación microscópica bajo el lente objetivo con aumento de 100X, de acuerdo con lo descrito en el párrafo 3.2.4.3. Cabe señalar que el orden de nombramiento de las colonias aisladas, corresponde al realizado en el párrafo anterior para la caracterización macroscópica.

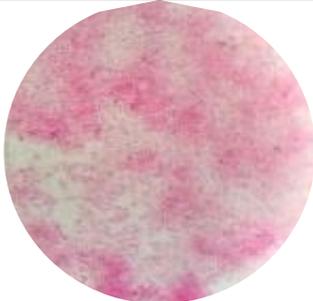
Cuadro 29. Caracterización microscópica de las colonias aisladas.

Muestra	Imagen	Morfología
A		Bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos.
B		Bacilos Gram negativos
C		Bacilos Gram negativos

Cuadro 29. (Continuación).

Muestra	Imagen	Morfología
D	 A circular microscopic image showing Gram-negative bacilli. The bacteria appear as pinkish-red rod-shaped structures against a lighter background.	Bacilos Gram negativos
E	 A circular microscopic image showing Gram-negative bacilli and actinomycetes. The bacteria appear as pinkish-red rod-shaped structures, with some darker, more irregular shapes scattered throughout.	Bacilos Gram negativos y actinomicetos
F	 A circular microscopic image showing Gram-negative bacilli. The bacteria appear as pinkish-red rod-shaped structures, with some darker, more irregular shapes scattered throughout.	Bacilos Gram negativos
G	 A circular microscopic image showing Gram-negative coccobacilli. The bacteria appear as pinkish-red rod-shaped structures, with some darker, more irregular shapes scattered throughout.	Cocobacilos Gram negativos
H	 A circular microscopic image showing Gram-negative coccobacilli and actinomycetes. The bacteria appear as pinkish-red rod-shaped structures, with some darker, more irregular shapes scattered throughout.	Cocobacilos Gram negativos y actinomicetos

Cuadro 29. (Continuación).

Muestra	Imagen	Morfología
I		Cocobacilos Gram negativos y actinomicetos

Fuente. Elaboración propia.

4.2.4 Selección de los microorganismos aptos para el tratamiento biológico. A partir de la caracterización macroscópica presentada en el **cuadro 28** y la caracterización microscópica presentada en el **cuadro 29**, se concluye que a pesar de que todas las cepas aisladas crecieron correctamente bajo las condiciones y nutrientes que requieren las BRS, no todas satisfacen los requerimientos planteados en el parágrafo 3.2.5 para su selección como aptas. Además, a pesar de que se realizaron dos procedimientos de aislamiento bacteriano para garantizar la pureza de todas las cepas, ciertas muestras como la A, E, H e I; resultaban contaminadas con otro tipo de microorganismo. En ese orden de ideas y teniendo en cuenta los criterios de selección, las cepas consideradas como aptas para el tratamiento biológico serían hasta el momento las cepas B, C, D y F. Sin embargo, hace falta verificar el cumplimiento del criterio de selección con mayor significancia para el tratamiento biológico de los ALU: la producción de sulfuro de hidrógeno gaseoso por parte de las cepas seleccionadas, ya que, es este gas el que hará contacto químico directo con los metales pesados presentes en la matriz del ALU y facilitará su separación.

En el **cuadro 30**, se presentan los resultados de la prueba de detección cualitativa de sulfuro de hidrógeno, aplicada a las cepas seleccionadas anteriormente como aptas para el tratamiento biológico de los ALU (cepas B, C, D, y F).

Cuadro 30. Resultados de la prueba de detección cualitativa de sulfuro de hidrógeno.

Cepa	Imagen	Resultado
B		Positivo

Cuadro 30. (Continuación).

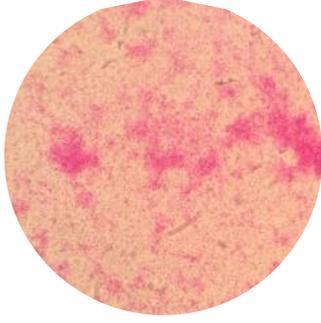
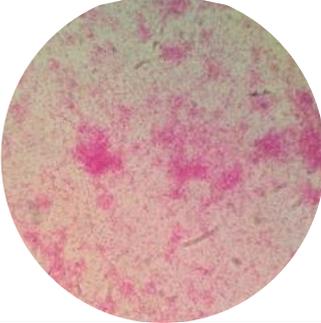
Cepa	Imagen	Resultado
C		Negativo
D		Positivo
F		Negativo

Fuente. Elaboración propia.

De acuerdo con los resultados expuestos en el **cuadro 30**, se escogen las *cepas B y D como aptas para el tratamiento biológico de los ALU*, pues se garantiza que estas mismas producen el gas de sulfuro de hidrógeno (coloración negra en la prueba de detección cualitativa de ácido sulfhídrico), además de satisfacer todos los criterios de selección presentados en el párrafo 3.2.5.

En el **cuadro 31**, se presenta una descripción de las cepas finalmente seleccionadas como aptas para el tratamiento biológico de los ALU. Esta descripción incluye el tipo de microorganismo aislado, su morfología, su reacción a la coloración de Gram y un ítem llamado “observaciones” el cual indica el tipo de anaerobiosis requerida por el microorganismo para su crecimiento y duplicación celular.

Cuadro 31. Descripción microscópica de las cepas seleccionadas para el tratamiento biológico.

Muestra	Imagen	Coloración de Gram	Descripción
B			<p>Microorganismo: bacteria.</p> <p>Reacción a la coloración de Gram: negativa.</p> <p>Morfología: bacilos en disposición celular individual.</p> <p>Observaciones: anaerobias facultativas.</p>
D			<p>Microorganismo: bacteria.</p> <p>Reacción a la coloración de Gram: negativa.</p> <p>Morfología: bacilos en disposición celular individual.</p> <p>Observaciones: anaerobias facultativas.</p>

Fuente. Elaboración propia.

Cabe resaltar que las dos cepas seleccionadas como aptas para el tratamiento biológico de los ALU fueron aisladas de la muestra de lodo termal, así que se infiere que dichas bacterias requieren un potencial de óxido - reducción (Eh) negativo muy alto para acelerar su tasa de crecimiento y duplicación. En ese orden de ideas, se realizó un experimento para aumentar dicha propiedad en el caldo de cultivo frente a las muestras anteriores; consistió en inocular una colonia de la cepa B en nuevo medio de cultivo Postgate C y aumentar el volumen de aceite mineral utilizado para la generación de la atmósfera anaerobia (200 mL), respecto a una muestra patrón de la cepa B con un volumen inferior de aceite mineral (100 mL). Ambas muestras se incubaron bajo las condiciones mencionadas anteriormente (37°C y 150 rpm, durante 15 días). Los resultados pueden observarse en la **imagen 7**, el frasco tapa rosca azul de la derecha corresponde a la muestra incubada con un volumen de aceite superior.

Imagen 7. Experimento del potencial negativo Eh.



Fuente. Elaboración propia.

Tal como se planteó, el inóculo al que se le añadió un mayor volumen de aceite mineral, presentó mayor turbidez que la muestra patrón (frasco tapa rosca azul de la izquierda), comprobando así que un aumento en el potencial redox negativo, aumenta la tasa de crecimiento y duplicación de las bacterias aisladas del lodo termal y seleccionadas como aptas para el tratamiento biológico, en otras palabras, a menor disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo de dichas bacterias, mayor tasa de crecimiento y duplicación de las mismas. Cabe señalar que la turbidez es un indicador de crecimiento bacteriano, a mayor turbidez mayor concentración de células en el medio de cultivo.

4.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS.

Tal como se mencionó en el numeral 3.3, se contrató con el laboratorio CorpoGen para que llevara a cabo los procedimientos correspondientes a la identificación molecular de las bacterias de la cepa B y la cepa D, seleccionadas como aptas para el tratamiento biológico de los ALU.

4.3.1 Identificación molecular de la cepa B. Utilizando los métodos descritos en el párrafo 2.3.6, el laboratorio CorpoGen ensambló una secuencia de una longitud de 1454 pares de bases nitrogenadas del gen ribosomal 16S, pertenecientes a la cepa B y realizó el análisis taxonómico de la secuencia problema mediante las herramientas BLAST del NCBI, comparándola contra la base de datos RNA de referencia “refseq_rna” y las herramientas “Classifier” y “SeqMatch”, comparándola contra la base de datos “16S rRNA training set 16” de RDP. En el **ANEXO R**, se presenta la secuencia ensamblada de la cepa B.

4.3.1.1 Herramienta “Classifier” de RDP. Esta herramienta determinó que la secuencia problema corresponde a un microorganismo perteneciente al género

Clostridium cluster XIVa, sin embargo, el poder de resolución de esta misma, no permitió asignar una especie. En el **ANEXO S**, se presenta el resultado de la comparación de la secuencia problema contra la base de datos de RDP.

4.3.1.2 Herramienta “SeqMatch” de RDP. Esta herramienta determinó que la secuencia problema presenta mayor homología con microorganismos de la especie *Clostridium celerecrescens*. En el **ANEXO T**, se presenta el resultado de la comparación de la secuencia problema contra *SeqMatch -RDP*.

4.3.1.3 Herramienta “ref_seq” del NCBI. Esta herramienta determinó que la secuencia problema tiene un 98% de identidad en el 100% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a la especie *Desulfotomaculum guttoideum*, en el 99% de su longitud con la especie *Clostridium celerecrescens* y en el 98% de su longitud con la especie *Clostridium sphenoides*. Sin embargo, cabe aclarar que “desde el año 1997, el género *Desulfotomaculum* fue excluido debido a su alto nivel de similitud a nivel de 16S con el género *Clostridium*”¹⁹⁸.

4.3.1.4 Árbol de distancias. Fue construido a partir de las treinta secuencias de microorganismos cultivables más cercanas, disponibles en la base de datos de NCBI RefSeq_RNA, la cual reporta que la secuencia problema se relaciona con secuencias de la especie *Clostridium celerecrescens*. En el **ANEXO U**, se presenta el árbol de distancias de dicha especie.

Para el año 2016 se reportaron 168 especies del género *Clostridium*, de las cuales 77 pertenecen al cluster I (*Clostridium sensu stricto*), definido por secuencia de 16S por Collins et al¹⁹⁹. Las 81 especies restantes están por fuera del grupo I y aun es incierta su asignación al género *Clostridium*, como parece ser el caso de la muestra analizada que pertenece al cluster XIVa. “A pesar de que actualmente el género *Clostridium* está constituido de forma incoherente a nivel fenotípico y de filogenia, es posible clasificar las muestras dentro del género *Clostridium*, pero no es posible asignar una especie ya que el nivel de similitud entre las secuencias de 16S es muy alto”²⁰⁰.

4.3.2 Identificación molecular de la cepa D. Utilizando los métodos descritos en el párrafo 2.3.6, no fue posible obtener secuencias de ácidos nucleicos del gen ribosomal 16S de calidad suficiente, para hacer un análisis bioinformático confiable de la identificación de esta cepa. En el **ANEXO V**, se presenta la secuenciación realizada según el método de Sanger para las muestras purificadas de rRna de la cepa D, en donde solo fue posible secuenciar 776 pares de bases nitrogenadas, la mayoría de baja calidad.

¹⁹⁸ Stackebrandt, E., et al., Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1997 Oct; 47(4): 1134-9.

¹⁹⁹ Collins, M.D., et al., The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol*, 1994. 44(4): p. 812-26.

²⁰⁰ CorpoGen. Informe de resultados No 1. Bogotá: 2018. p. 6.

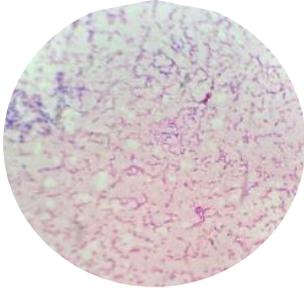
4.4 TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE ACEITES LUBRICANTES USADOS DE MOTOR DIÉSEL

A continuación, se presenta la discusión de los resultados obtenidos durante y después del tratamiento biológico de contacto directo entre las muestras de ALU proporcionadas por el CTT y las bacterias seleccionadas en el numeral anterior como aptas para este tratamiento. Además, se escogerá la muestra que removió la mayor cantidad de azufre y metales pesados según las herramientas estadísticas aplicadas para la evaluación cuantitativa del tratamiento y se comparará con la NTC 5995 “Petróleo y sus derivados, bases lubricantes re – refinadas” con el fin de determinar posibles usos del aceite tratado biológicamente en la industria automotriz.

4.4.1 Pretratamiento del aceite lubricante usado. Las muestras de ALU se filtraron al vacío, con el fin de eliminar los contaminantes de mayor tamaño presentes en el mismo, pues como se mencionó en el párrafo 3.4.2, estos interrumpen microscópicamente el contacto bacteria – metal pesado, al ocupar los sitios activos de la membrana externa celular.

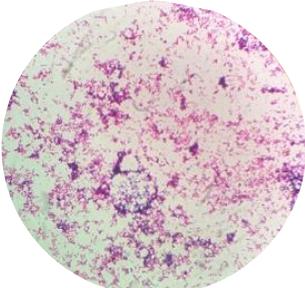
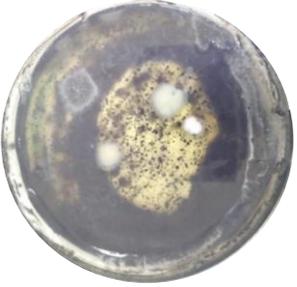
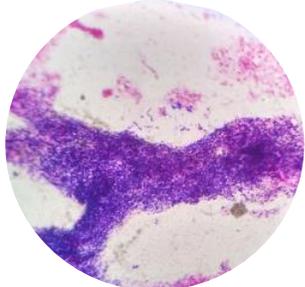
Además, se planteó teóricamente la probabilidad de que las muestras a utilizar en el tratamiento biológico de los ALU presenten contaminación microbiana, pues dichas muestras habían estado expuestas a la atmósfera y pudieron haberse contaminado con esporas típicas de la contaminación ambiental. Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó un experimento que consistió en la siembra por extensión en superficie de 0.1 mL de ALU filtrado al vacío, sobre medio de cultivo Agar Tripticasa Soya solidificado (bastante utilizado para “favorecer el desarrollo de una gran variedad de microorganismos aerobios”²⁰¹) y las muestras se incubaron bajo condiciones de aerobiosis en la incubadora estándar, ajustada a 37°C durante ocho días. En el **cuadro 32**, se presentan los resultados de dicho experimento una vez transcurrido el tiempo de incubación.

Cuadro 32. Descripción de los microorganismos presentes en los ALU.

Muestra	Imagen	Coloración de Gram	Descripción
1			Muestra de ALU contaminada con streptobacilos Gram negativos de tamaño grande, con endoespora central deformante.

²⁰¹ BRITANIALAB. Tripteína Soya Agar [en línea]. (noviembre de 2015), párr. 1. Disponible en Internet: http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a297bfd85301.pdf.

Cuadro 32. (Continuación).

Muestra	Imagen	Coloración de Gram	Descripción
2			Muestra de ALU contaminada con streptobacilos Gram negativos curvos y streptobacilos Gram positivos curvos sin endoespora.
3			Muestra de ALU contaminada con cocos y bacilos Gram positivos de tamaño pequeño sin endoespora.

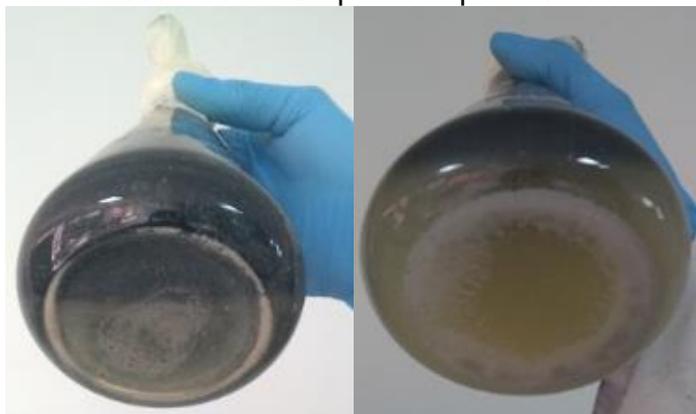
Fuente. Elaboración propia.

Se verificó la teoría propuesta por los investigadores: el ALU contiene microorganismos propios de la contaminación ambiental, por lo tanto, se hizo necesario esterilizar las muestras de ALU antes del tratamiento biológico, pues según los requerimientos mencionados en el parágrafo 3.2.5, los microorganismos encontrados en la matriz del aceite usado no son aptos para el tratamiento biológico.

4.4.2 Evaluación cualitativa. Se presenta la evaluación cualitativa del tratamiento biológico de los ALU. Este análisis se realizó semanalmente a todas las muestras tratadas durante el tiempo de experimentación (29 días), junto con la prueba de detección cualitativa de sulfuro de hidrógeno.

4.4.2.1 Muestras de ALU tratadas con la cepa B. Transcurrida una semana de experimentación se observaron los resultados más notables, pues aparece la mayor cantidad de precipitado que se observará durante el tiempo de experimentación, a pesar de que en todos los ensayos aumentó la formación de dicho precipitado con el tiempo. En la **imagen 8**, se muestra el precipitado obtenido en los experimentos llevados a cabo con la cepa B, una vez transcurrido el tiempo de experimentación. De izquierda a derecha, el ensayo de 50%Inóculo/50%ALU y 75%Inóculo/25%ALU.

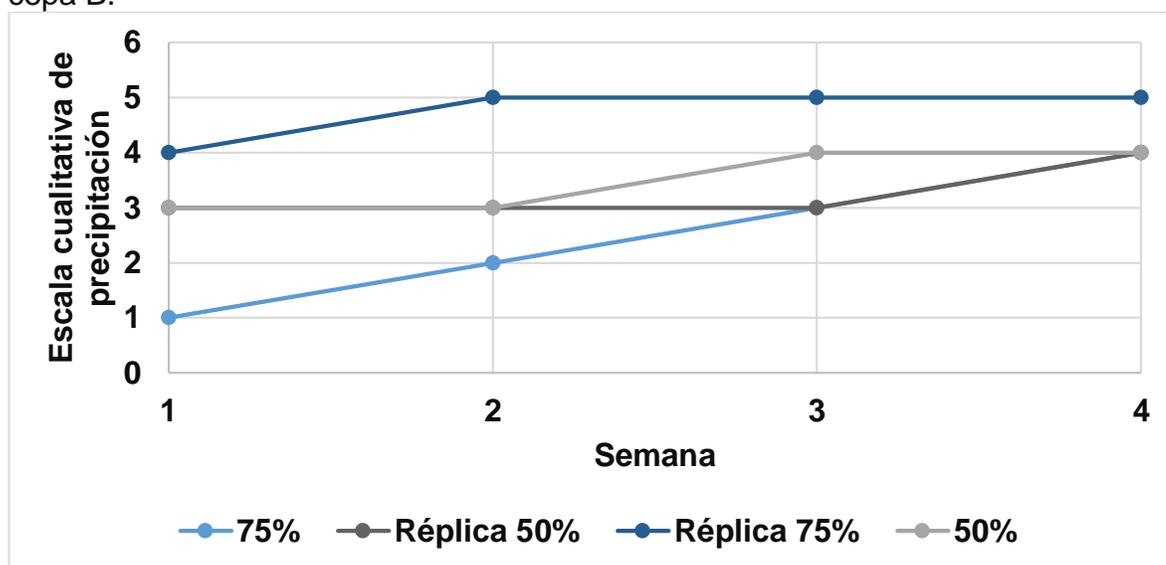
Imagen 8. Precipitado obtenido en los experimentos llevados a cabo con la cepa B, una vez transcurrido el tiempo de experimentación.



Fuente. Elaboración propia.

En la **gráfica 5**, se presenta una descripción cualitativa semanal de la formación de precipitado en todos los ensayos y réplicas del tratamiento biológico de los ALU con la cepa B, durante el tiempo de experimentación. Cabe señalar que la réplica del experimento llevado a cabo en la proporción 75%Inóculo-25%ALU, fue la que condujo a la formación de una mayor cantidad de precipitado.

Gráfica 5. Formación de precipitado en el tratamiento biológico de los ALU con la cepa B.

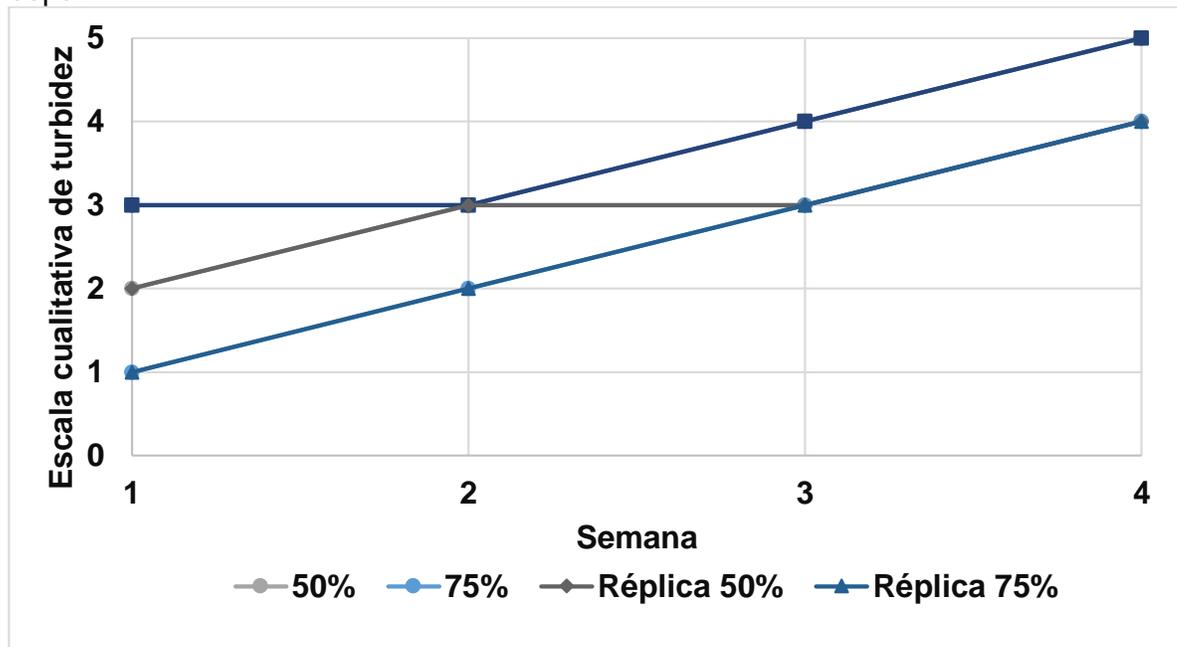


Fuente. Elaboración propia.

Por otra parte, y tal como se evidencia en la **gráfica 6**, la turbidez de los inóculos de todos los ensayos llevados a cabo con la cepa B y sus réplicas, aumentó gradualmente con el tiempo de experimentación, esto confirma el aumento de la

población bacteriana durante el tratamiento biológico. Además, a partir de la segunda semana de experimentación comienza la formación de una estructura porosa de coloración blanca adherida irreversiblemente a las paredes de los matraces de Erlenmeyer, en el lugar donde se encuentra la interfaz ALU/Inóculo. Cabe señalar que el ALU no cambió de apariencia en ninguno de los experimentos llevados a cabo con la cepa B y la prueba de detección cualitativa de sulfuro de hidrógeno resultó negativa en todos los ensayos realizados durante el tiempo de experimentación.

Gráfica 6. Turbidez de los inóculos en el tratamiento biológico de los ALU con la cepa B.

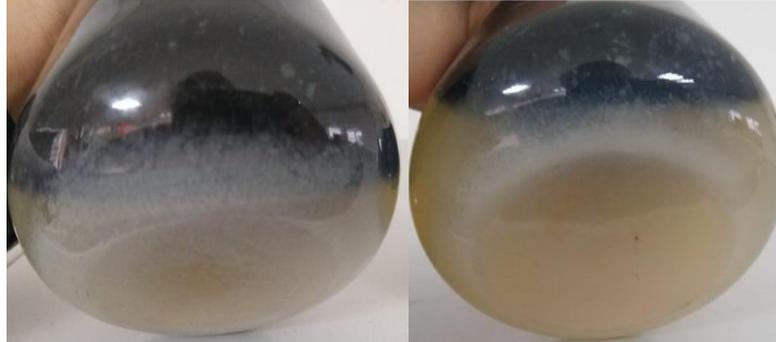


Fuente. Elaboración propia.

4.4.2.2 Muestras de ALU tratadas con la cepa D. A diferencia del patrón de precipitación presentado en los ensayos llevados a cabo con la cepa B, los resultados más notables de precipitación aparecen hasta la tercera semana, a pesar de que en las dos primeras se observa la formación de un ligero precipitado.

En la **imagen 9**, se muestra el precipitado obtenido en los experimentos llevados a cabo con la cepa D, una vez transcurrido el tiempo de experimentación. De izquierda a derecha, el ensayo de 50%Inóculo/50%ALU y 75%Inóculo/25%ALU.

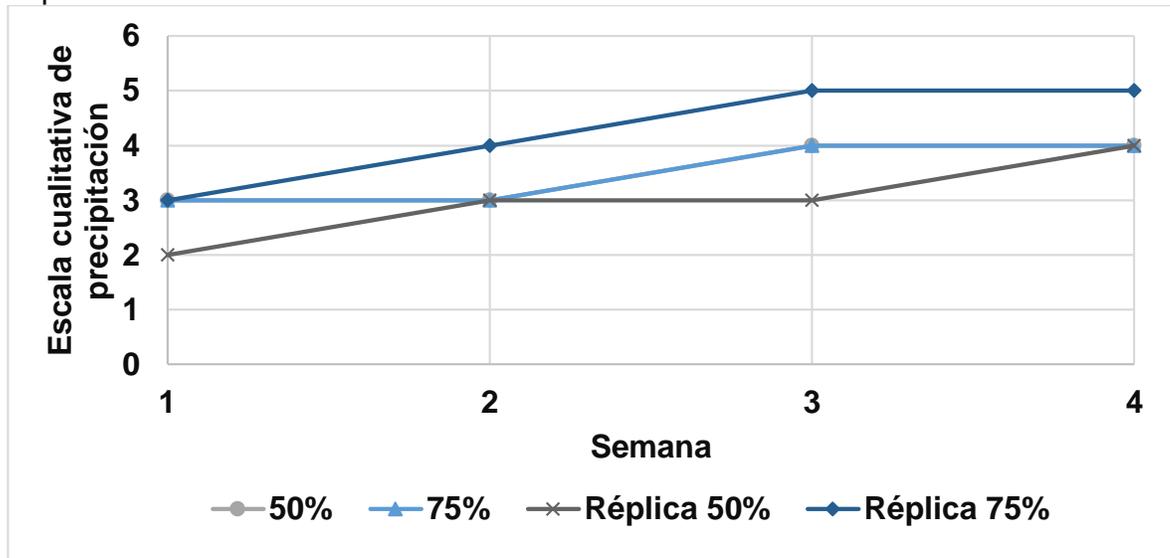
Imagen 9. Precipitado obtenido en los experimentos llevados a cabo con la cepa D, una vez transcurrido el tiempo de experimentación.



Fuente. Elaboración propia.

En la **gráfica 7**, se presenta una descripción cualitativa semanal de la formación de precipitado en todos los ensayos y réplicas del tratamiento biológico de los ALU con la cepa D, durante el tiempo de experimentación. Cabe señalar que el experimento llevado a cabo en la proporción 75%Inóculo-25%ALU y su réplica, fueron los que condujeron a la formación de una mayor cantidad de precipitado.

Gráfica 7. Formación de precipitado en el tratamiento biológico de los ALU con la cepa D.

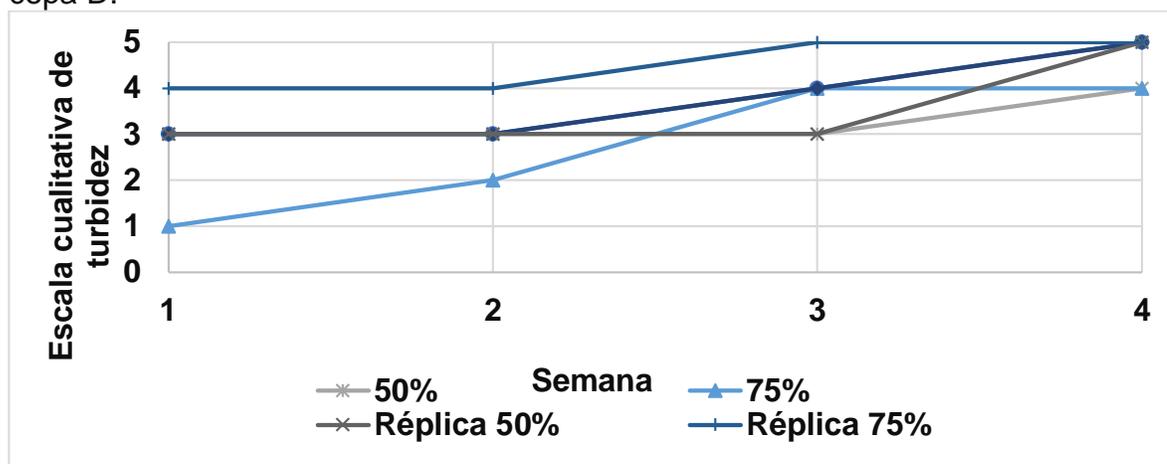


Fuente. Elaboración propia.

Al igual que lo reportado con la cepa B y tal como se evidencia en la **gráfica 8**, la turbidez de los inóculos de los experimentos llevados a cabo con la cepa D, aumentó gradualmente con el tiempo de experimentación y a partir de la segunda semana comenzó la formación de una estructura porosa de coloración blanca adherida irreversiblemente a las paredes de los matraces de Erlenmeyer, en el lugar de la

interfaz ALU/Inóculo. El ALU tampoco cambió de apariencia en alguno de los experimentos y la prueba de detección cualitativa de sulfuro hidrógeno resultó negativa en todos los ensayos realizados durante el tiempo de experimentación.

Gráfica 8. Turbidez de los inóculos en el tratamiento biológico de los ALU con la cepa D.



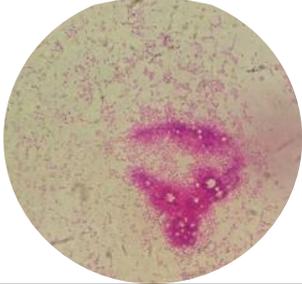
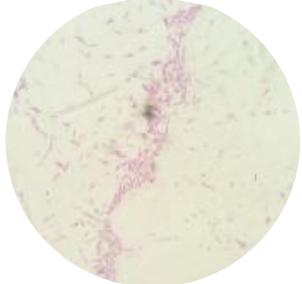
Fuente. Elaboración propia.

A partir de los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa del tratamiento biológico de contacto directo entre las bacterias de las cepas B y D, y las muestras de ALU tratadas en los experimentos al 50%Inóculo-50%ALU y 75% Inóculo/25%ALU, se puede concluir mediante inspección visual que la precipitación fue más uniforme y repetible en todos los experimentos llevados a cabo al 50% Inóculo-50%ALU independientemente de la cepa utilizada, a pesar, de que se observa la formación de una cantidad mayor de precipitado en los experimentos llevados a cabo al 75% Inóculo/25%ALU. Sin embargo, es preciso llevar a cabo el análisis cuantitativo de todas las muestras de ALU tratadas, ya que el medio de cultivo Postgate C posee todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y duplicación de las bacterias allí presentes, dentro de estos, pequeñas cantidades de metales que también fueron evaluados en la experimentación y que pueden estar favoreciendo el hecho de que visualmente se observe una mayor cantidad de precipitado en los experimentos.

En todos los experimentos se reportó después de la primera semana de tratamiento biológico, la formación de una estructura porosa de coloración blanca adherida irreversiblemente a las paredes de los matraces de Erlenmeyer, en el lugar donde se encuentra la interfaz ALU/Inoculo. Según lo reportado en el parágrafo 1.7.1.7, es muy probable que dicha estructura sea una biopelícula construida por la comunidad bacteriana presente en el inóculo, para llevar a cabo dentro de sí su ruta metabólica. Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó un raspado de la estructura porosa presente en la interfaz Inóculo/ALU de los matraces de Erlenmeyer, al final de los

experimentos llevados a cabo al 75% Inóculo/25%ALU y se les realizó coloración de Gram, los resultados de este experimento se presentan en el **cuadro 33**.

Cuadro 33. Caracterización microscópica de las estructuras porosas formadas en los matraces de experimentación.

Experimento	Imagen	Morfología
75% Inóculo de la cepa B /25%ALU		Bacilos Gram negativos de tamaño pequeño.
75% Inóculo de la cepa D /25%ALU		Bacilos Gram negativos de tamaño pequeño.

Fuente. Elaboración propia.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos en el **cuadro 33**, se reporta que la estructura porosa de coloración blanca adherida irreversiblemente a las paredes de los matraces de Erlenmeyer, corresponde a una biopelícula formada por la población bacteriana presente en el inóculo de experimentación (cepas B y D) y que es en este lugar en donde se lleva a cabo la ruta metabólica de la reducción disimilativa de sulfatos.

Para finalizar el análisis cualitativo, es posible señalar que la prueba de detección cualitativa de sulfuro de hidrógeno resultó negativa en todos los experimentos planteados para el tratamiento de los ALU. Esto se presentó como un indicador positivo para la precipitación de los metales presentes en la matriz de los mismos, pues indica que todo el sulfuro de hidrógeno que está siendo producido por las bacterias presentes en el tratamiento, está siendo atrapado por el ALU y molecularmente está reaccionando con los metales allí presentes, formando sulfuros metálicos que precipitan con la biomasa bacteriana, tal como se expuso en la **ecuación 11**.

4.4.3 Evaluación cuantitativa. En los siguientes párrafos se presentan los resultados del diseño de experimentos, caracterización inicial, el parámetro de sulfatación y se realiza su respectivo análisis de resultados.

4.4.3.1 Caracterización inicial. La muestra inicial de ALU, la cual no había sido sometida al tratamiento biológico, pero si al acondicionamiento físico, reporto los datos expuestos en el **ANEXO I**. Comparando los datos reportados, con los obtenidos por Silva, Quiñonez y Tejada Tovar²⁰², se evidencian diferencias de concentraciones en elementos como por ejemplo, el cobre, hierro y fósforo donde el ALU tomado del CTT contiene 70% o más en concentración de los elementos mencionados, otros elementos como el aluminio reportaron valores similares y el sodio reporto un valor 50% menor en comparación con el reportado por los autores. La diferencia de concentraciones entre los autores mencionados y el ALU del CTT, se sitúa principalmente en las condiciones a las cuales está expuesto el aceite y al nivel de mantenimiento del motor. La concentración de cobre fue 71% mayor, se debe a que existe un mayor desgaste en el cigüeñal y cojinetes²⁰³, además, el desgaste del motor también está ligado a la corrosión que este presenta, eso hace que la concentración de hierro sea 80% mayor. La concentración 50% menor de sodio en el ALU del CTT se debe a que no entra en contacto con agentes refrigerantes, los cuales contienen bicromato de sodio como inhibidores de la corrosión²⁰⁴, adicionalmente hay elementos presentes en el ALU que cumplen funciones de dispersantes y de antidesgaste, como lo son el magnesio, fósforo, calcio y zinc, donde su concentración varía de un fabricante a otro²⁰⁵.

4.4.3.2 Resultados del tratamiento. De los 20 elementos caracterizados, se seleccionaron 10 para llevar a cabo el análisis estadístico y de resultados. Los criterios de selección se enfocaron en las investigaciones realizadas por Chambe²⁰⁶ y por Pérez, et al²⁰⁷, además, el ALU del CTT contenía concentraciones de 0 o 1 ppm de plomo, manganeso, níquel, plata, estaño, titanio, vanadio, bario. A pesar de que, por ejemplo, el plomo es un metal pesado y un elemento tóxico²⁰⁸, no se tuvo en cuenta porque el Decreto 1446 de 2005²⁰⁹, permite el uso del ALU como combustible con concentraciones máximas de plomo de 10 ppm y 8 ppm de cromo. Los metales pesados analizados fueron hierro, cobre, molibdeno y zinc, sumado a estos, se analizaron metales no pesados como sodio, aluminio, calcio y magnesio, los cuales se incluyeron por su presencia en el medio de cultivo Postgate C y para finalizar se incluyeron el fósforo y el silicio, por su requerimiento en la normativa de lubricantes con la cual se va a comparar el aceite tratado y así determinar el posible uso en la industria automotriz. En el **cuadro 34**, se presentan los resultados

²⁰² SILVA FONG, Waldyr. BOLAÑOS, Edgar. TOVAR, Candelaria. Caracterización físico-química de aceites usados de motores para su reciclaje. Facultad de ingeniería, Universidad de Cartagena. Vol. 15, 2017, p.137-139.

²⁰³ *Ibíd.*, p. 139.

²⁰⁴ *Ibíd.*, p. 140.

²⁰⁵ MOBIL, Catálogo de lubricantes.

²⁰⁶ CHAMBE. *Op. cit.*, p. 72.

²⁰⁷ CIBATI, *Op. cit.*, p. 2.

²⁰⁸ ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Intoxicación por plomo y salud [En línea]. Agosto, 2018. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>

²⁰⁹ COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Resolución 1446 (5, octubre, 2005).*Op. cit.*, p. 72.

obtenidos luego del tratamiento biológico, los cuales se obtuvieron a partir de la **ecuación 13**.

Ecuación 13. Formula de obtención del porcentaje de remoción.

$$\% \text{ Remoción} = \frac{C_o - C_f}{C_o} * 100$$

Fuente. Elaboración propia.

Cuadro 34. Resultados obtenidos en el tratamiento biológico de los ALU.

	Cepa B		Réplica B		Cepa D		Réplica D	
	50%	75%	50%	75%	50%	75%	50%	75%
Fósforo	10,8	-26,4	-10,3	-24,2	23,6	-15,5	18,6	-15,4
Hierro	64,5	87,1	53,2	85,5	53,2	75,8	41,9	79,0
Zinc	0,5	-30,6	-7,6	-29,8	15,2	-18,3	12,4	-18,4
Cobre	44,4	77,8	44,4	72,2	33,3	61,1	22,2	66,7
Silicio	50,0	76,9	38,5	76,9	57,7	80,8	57,7	82,7
Sodio	-2,1	27,4	12,6	-3,2	-32,6	-10,5	-36,8	8,4
Aluminio	52,6	84,2	57,9	84,2	52,6	73,7	42,1	73,7
Molibdeno	10,3	-48,3	-20,7	-37,9	10,3	-24,1	-13,8	-24,1
Calcio	0,35	-0,95	7,97	12,05	-4,85	-0,95	-5,63	-0,69
Magnesio	14,1	-49,6	-23,9	-41,1	2,7	-30,6	0,4	-24,6

Fuente. Elaboración propia.

En el cuadro anterior, se observa que algunos de los porcentajes de remoción tienen signo negativo, esto tiene un sentido físico, pues indica que la concentración de estos elementos aumentó en el ALU, después del tratamiento.

4.4.3.3 Análisis estadístico. El análisis estadístico del diseño de experimentos se realizó mediante la herramienta de *análisis de datos* de Excel²¹⁰, en donde se desarrolló un análisis de varianza ANOVA, buscando determinar cómo actuaron los factores de diseños o estudiados sobre las variables respuesta²¹¹. En la **tabla 6**, se presenta la nomenclatura utilizada en las tablas de resultado del ANOVA, para este análisis se utilizó un alfa de 0,05.

Tabla 6. Nomenclatura del análisis ANOVA.

Nomenclatura	Significado
A	Cepa utilizada
B	% Volumen
AB	Interacción entre AB

Fuente. Elaboración propia.

²¹⁰ Microsoft Excel, versión 2014.

²¹¹ GUTIÉRREZ. Op. cit., p. 10-12.

El análisis de varianza ANOVA, se realizó por cada una de las variables respuestas, en este caso, los 10 metales mencionados anteriormente:

Fósforo. La concentración de fósforo estuvo supeditada al cambio de volumen, debido a que el $F_B > F_C$, además su probabilidad dio un orden de magnitud por debajo del alfa, sin embargo, el $F_A > F_C$, pero su probabilidad dio exactamente igual al alfa, lo cual muestra que no hay cambios estadísticos significativos. Por lo tanto, la variación de la cepa, no afecta la remoción de fósforo, mientras que la variación de volumen entre 50% y 75% tiene una incidencia estadística significativa.

Tabla 7. ANOVA para la remoción de fósforo.

Fósforo	F	Probabilidad	Valor crítico para F
A	7,88	0,05	7,71
B	32,37	5,00E-03	7,71
AB	1,02	0,37	7,71

Fuente. Elaboración propia.

Hierro. La concentración de hierro estuvo atada al cambio de volumen, más no a la variación de la cepa, debido a que el $F_B > F_C$, y su probabilidad tiene un orden de magnitud por debajo del alfa. La variación de la cepa no tiene relevancia estadística para remover este metal pesado.

Tabla 8. ANOVA para la remoción de hierro.

Hierro	F	Probabilidad	Valor crítico para F
A	6,07	0,07	7,71
B	48,94	2,00E-03	7,71
AB	0,09	0,78	7,71

Fuente. Elaboración propia.

Zinc. La concentración de zinc, fue incidida por la variación de la cepa y la variación del volumen, ya que, tanto F_A y F_B son mayores a F_C , claro que, la variación de volumen tiene una mayor incidencia, sin embargo, ambas son significativas, ya que la probabilidad de A y B se encuentran uno y dos órdenes de magnitud por debajo de alfa.

Tabla 9. ANOVA para la remoción de Zinc.

Zinc	F	Probabilidad	Valor crítico para F
A	46,81	2,00E-03	7,71
B	189,59	2,00E-04	7,71
AB	1,65	0,27	7,71

Fuente. Elaboración propia.

Cobre. La concentración de cobre tuvo variación significativa, cuando se varió el volumen entre 50% y 75%, además, la probabilidad se encuentra dos órdenes de magnitud por debajo del alfa. A pesar de que $F_A > F_C$, este no cuenta con varianza significativa en el experimento, debido a la similitud entre la probabilidad y el alfa.

Tabla 10. ANOVA para la remoción de Cobre.

Cobre	F	Probabilidad	Valor crítico para F
A	16,67	0,02	7,71
B	96	6,00E-04	7,71
AB	0,67	0,46	7,71

Fuente. Elaboración propia.

Silicio. Para la concentración de silicio del ALU, fue significativo variar tanto la cepa como el volumen, sin embargo, la probabilidad del factor B es 2 órdenes de magnitud menor que alfa, lo cual le da un mayor peso estadístico.

Tabla 11. ANOVA para la remoción de Silicio.

Silicio	F	Probabilidad	Valor crítico para F
A	9,76	0,04	7,71
B	94,08	6,00E-04	7,71
AB	2,19	0,21	7,71

Fuente. Elaboración propia.

Sodio. La concentración de sodio, mostró variación cuando se alternó la cepa entre B y D, sin embargo, el $F_A < F_C$, por ende, la variación que tuvo, no fue estadísticamente significativa.

Tabla 12. ANOVA para la remoción de Sodio.

Sodio	F	Probabilidad	Valor crítico para F
A	7,41	0,05	7,71
B	4,31	0,11	7,71
AB	1,89	0,24	7,71

Fuente. Elaboración propia.

Aluminio. La concentración del metal de aluminio, se dio principalmente por la variación de volúmenes de entre 50% y 75%, debido a que el $F_B > F_C$ y tuvo una probabilidad dos órdenes por debajo del alfa, lo cual es estadísticamente significativo. Por otro lado, el $F_A > F_C$, sin embargo, sus valores son muy cercanos, es decir que existe una incidencia en la variación de la cepa, pero no es tan pronunciada como la variación del volumen.

Tabla 13. ANOVA para la remoción de Aluminio.

Aluminio	F	Probabilidad	Valor crítico para F
A	9,8	0,04	7,71
B	88,2	7,00E-04	7,71
AB	0,2	0,68	7,71

Fuente. Elaboración propia.

Molibdeno. La concentración de este metal pesado, se obtuvo que $F_B > F_C$, indicando que la variación del volumen, fue el factor de estudio que indujo este resultado, por otro lado, la variación de la cepa no tuvo ningún efecto sobre la remoción de este metal, su probabilidad es dos órdenes de magnitud por encima de alfa.

Tabla 14. ANOVA para la remoción de Molibdeno.

Molibdeno	F	Probabilidad	Valor crítico para F
A	1,22	0,33	7,71
B	8,81	0,04	7,71
AB	0,58	0,49	7,71

Fuente. Elaboración propia.

Calcio. La variación en la concentración de este metal, no fue incidida por ninguno de los dos factores estudiados, debido a que tanto F_A como F_B son menores a F_C , indicando que ninguno de los dos factores tuvo una significancia alguna, además esto indica que el elemento, no sufrió variaciones de concentración en los 8 experimentos.

Tabla 15. ANOVA para la remoción de Calcio.

Calcio	F	Probabilidad	Valor crítico para F
A	4,37	0,1	7,71
B	0,59	0,48	7,71
AB	0,16	0,71	7,71

Fuente. Elaboración propia.

Magnesio. La variación de magnesio, se dio debido a la variación de los volúmenes entre 50% y 75%, ya que el $F_B > F_C$, la variación de la cepa entre B y D no tuvo ningún efecto estadístico sobre la variable respuesta.

Tabla 16. ANOVA para la remoción de Magnesio.

Magnesio	F	Probabilidad	Valor crítico para F
A	1,5	0,29	7,71
B	12,43	0,02	7,71
AB	0,33	0,6	7,71

Fuente. Elaboración propia.

De los 10 elementos analizados, 4 de ellos presentaron varianza estadísticamente significativa cuando se varió el volumen y se modificó la cepa, estos elementos fueron zinc, cobre, silicio y aluminio, por lo tanto, el cambio de la cepa y del porcentaje del inóculo en volumen, afecta la concentración final obtenida por las variables respuesta. Por otro lado, el hierro, molibdeno, fósforo y magnesio tuvieron comportamientos de aumento o reducción en la concentración con la variación del volumen de entre 50% y 75%. Las cepas B y D, demostraron interacción con los metales presentes, lo que demuestra que los dos microorganismos pueden ser utilizados en procesos de descontaminación. Los resultados para el calcio y el sodio, mostraron que ninguna de las variables estudiadas tiene incidencia sobre el comportamiento de la variable respuesta.

La interacción AB, entre la variación de la cepa y el cambio del porcentaje de volumen en el tratamiento, no tuvo incidencia significativa sobre ninguna de las variables de respuesta, esto se debe a que ningún F_{AB} fue mayor al F_C y por lo tanto se descarta la importancia de la interacción entre las variables estudiadas.

4.4.3.4 Remoción de elementos. Ninguno de los experimentos logró disminuir todos los elementos evaluados. En el **cuadro 35**, se presentan el número de elementos que redujo o aumento y cuales fueron. El experimento de la cepa B con un porcentaje de inóculo de 50%, fue el que logró reducir más elementos, con un total de 9, experimento que menos elementos redujo, fue el de la cepa D con un porcentaje de 75% de ALU, con un total de 4. Haciendo un balance general entre los experimentos de 50% y de 75%, se evidencia que, los experimentos de 50% reducen en promedio 7 elementos, mientras que los de 75% reducen la concentración de 4, haciendo el mismo balance, pero variando entre la cepa B y la cepa D, se determinó que las dos cepas reducen en promedio 6 elementos.

Cuadro 35. Comparación de experimentos, de manera cualitativa.

		Número de elementos reducidos	Elementos reducidos	Número de elementos adicionados	Elementos adicionados
Cepa B	50%	9	P, Fe, Zn, Cu, Si,	1	Na
	75%	5	Fe, Cu, Si, Al, Na.	5	Mo, Zn, P, Ca, Mg.
Réplica B	50%	6	Fe, Cu, Si, Na, Al, Ca.	4	P, Mo, Zn, Mg.
	75%	5	Fe, Si, Cu, Al, Ca.	5	Na, Mo, Zn, P, Mg.
Cepa D	50%	8	P, Fe, Zn, Cu, Si, Al, Mo, Mg.	2	Na, Ca.
	75%	4	Fe, Cu, Si, Al, Mg.	6	Na, Mo, Zn, P, Ca, Mg.
Réplica D	50%	7	P, Fe, Zn, Cu, Si, Al, Mg	3	Na, Mo, Ca.

Cuadro 35. (Continuación).

		Número de elementos reducidos	Elementos reducidos	Número de elementos adicionados	Elementos adicionados
Réplica D	75%	5	Fe, Cu, Si, Na, Al.	5	Fe, Cu, Si, Na,

Fuente. Elaboración propia

El hierro, cobre, aluminio y silicio se reducen en todos los experimentos, este fenómeno concuerda con lo expuesto por Chambe²¹², donde el tratamiento de mina que realizó, redujo en su gran mayoría hierro, cobre y aluminio, por otro lado, los metales que más veces aumentaron su concentración fueron el molibdeno, fósforo, sodio y magnesio. Los incrementos de estos elementos provienen de diferentes fuentes, principalmente de aditivos, que se fueron desgastando paulatinamente durante el tratamiento biológico, debido a que el ALU estuvo en contacto directo con agua y eso pudo provocar la reducción de la vida útil de los antioxidantes, liberando zinc, fósforo y molibdeno, sumado al magnesio proveniente de los agentes dispersantes. Otra fuente que pudo alimentar el aumento de concentración, fue el medio de cultivo Postgate C, el cual contiene algunos de estos, principalmente fósforo y sodio, como se presenta en la **tabla 17**.

Tabla 17. Elementos presentes en el medio de cultivo Postgate C.

Elemento	Concentración (ppm)
Calcio (Ca)	2,16E-05
Magnesio (Mg)	1,21E-05
Fósforo (P)	0,0089
Sodio (Na)	0,0037
Hierro (Fe)	1,47E-06

Fuente. Elaboración propia.

4.4.3.5 Sulfatación. Una medida indirecta para evaluar la remoción de azufre del ALU, es la sulfatación, la cual se explica en el párrafo 1.5.2.3. El azufre no aparece en forma de elemento puro en los ALU, sino que su presencia está en compuestos orgánicos, sulfuros y ceras sulfuradas. Estos compuestos son utilizados para la formulación de aditivos, además el azufre aparece como compuesto órgano azufrado, resultante de la reacción entre los productos de la combustión, el aire y el aceite lubricante. En el **cuadro 36**, se presentan los niveles de sulfatación obtenidos en los 8 experimentos y el nivel inicial que fue de 0,09 A/0,1mm.

²¹²CHAMBE. Op. cit., p. 80.

Cuadro 36. Parámetros de sulfatación obtenidos por el tratamiento biológico.

Inicial	Cepa B		Réplica B		Cepa D		Réplica D	
	50%	75%	50%	75%	50%	75%	50%	75%
0,09								
Sulfatación (A/0,1mm)	0	0	0	0	0,04	0	0,02	0

Fuente. Elaboración propia.

Todos los tratamientos de la cepa B, lograron eliminar por completo todos los compuestos que contenían azufre en su estructura. La cepa D en los tratamientos de 50% Inóculo-50% ALU, no logró reducirlo en su totalidad, pero si en más de 50% de su totalidad. Las dos cepas de bacterias como se analizó en el ANOVA, determino que la cepa no era el factor de diseño que hacía variar la concentración de metales, es decir que las dos eran especies similares de bacterias. Con el resultado de la identificación bacteriana, que arrojó como resultado que la cepa B era del genero *Clostridium celerecrescens*, y esta a su vez es catalogada como una bacteria sulfato reductora, determina que los sulfatos y sulfitos presentes en el ALU fueron consumidos por el consorcio bacteriano para llevar a cabo reacciones de respiración celular como la presentada en la **ecuación 10**.

4.4.3.6 Calidad del ALU. Para evaluar la calidad del ALU tratado, se contrasto con la NTC-5995²¹³, y se compararon con los parámetros de concentración de los elementos, presentados en la **tabla 18**, en esta tabla se presenta el porcentaje de remoción requerido del ALU tratado para ser utilizado de nuevo como una base lubricante. El fósforo como se presenta en la **tabla 18**, es el elemento requerido por la norma técnica, que debe reducir en 98% su concentración en el ALU para cumplirla. A diferencia del aluminio y el cobre que ya cumplen la especificación, y por último el hierro y el aluminio que deben remover 19% y 4% respectivamente para cumplir la norma.

Tabla 18. Parámetros de la NTC-5995.

Elemento	Concentración requerida-norma(ppm)	Inicial ALU sin tratar (ppm)	Porcentaje requerido
Fósforo	15	785	98
Silicio	50	52	4
Aluminio	50	19	CUMPLE
Cobre	50	18	CUMPLE
Hierro	50	62	19

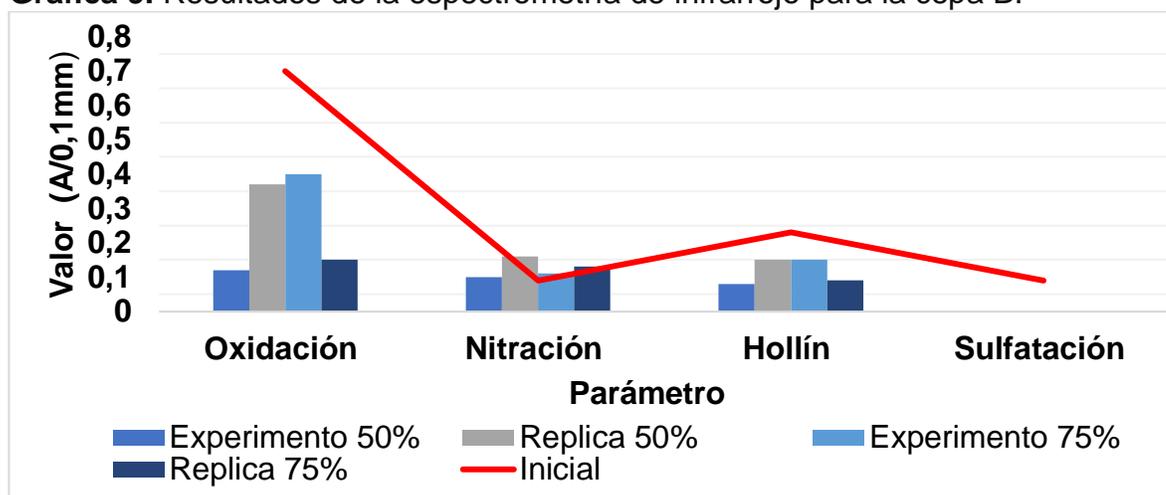
Fuente. ICONTEC. Petróleo y sus derivados. Bases lubricantes re-refinadas. 2013

En la **gráfica 9**, se presentan los resultados de oxidación, nitración, sulfatación y hollín para la cepa B, de todos sus montajes. La línea roja representa el valor inicial

²¹³ ICONTEC. Petróleo y sus derivados. Bases lubricantes re-refinadas.

de cada uno de los parámetros, se puede observar la reducción en oxidación, nitración y sulfatación. El parámetro de nitración se mantuvo estable, y en la réplica de 50% inóculo-50% ALU aumento su pico de absorbancia con respecto a la inicial. El experimento de la cepa B con 50% inóculo-50% ALU, presento los resultados registrados en la **gráfica 10**, donde se muestran los porcentajes de remoción por metal, para la réplica y el experimento. El fósforo tuvo un porcentaje de remoción de 10%, para el silicio un porcentaje de reducción de 52%, el aluminio redujo su concentración en 60%, el cobre en un 44% y para el hierro del 64%, siendo este el porcentaje más alto. Para evaluar la calidad del ALU tratado, se contrastaron los resultados obtenidos antes y después del tratamiento biológico con la NTC-5995.

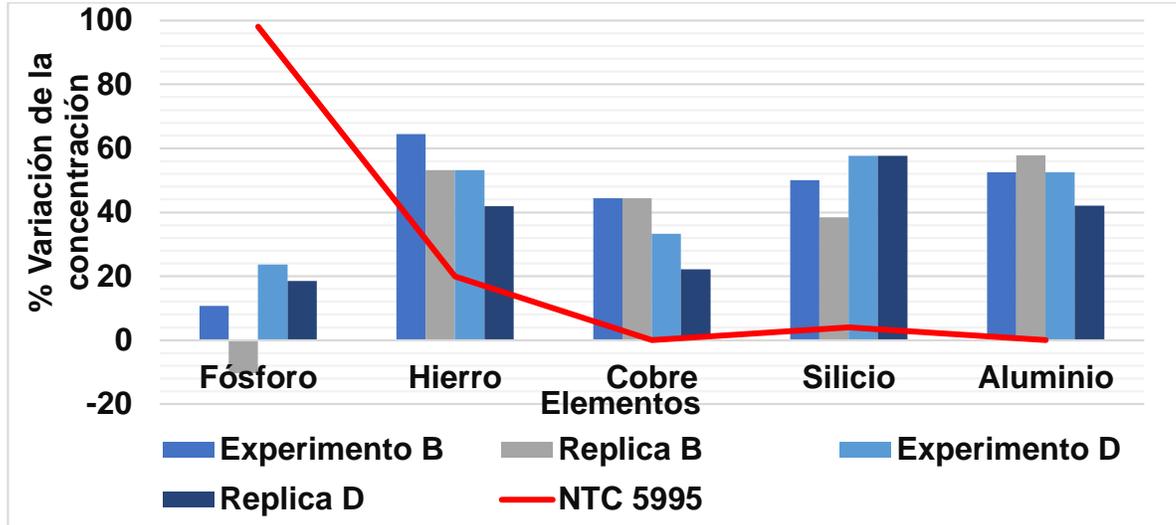
Gráfica 9. Resultados de la espectrometría de infrarrojo para la cepa B.



Fuente. Elaboración propia.

En la **gráfica 10**, se presentan los resultados de los tratamientos realizados con el volumen de 50% Inóculo/ALU, se observa que el fósforo alcanza niveles máximos de remoción del 20%, a diferencia del hierro, cobre, silicio y aluminio que estuvieron todos por encima de 40%.

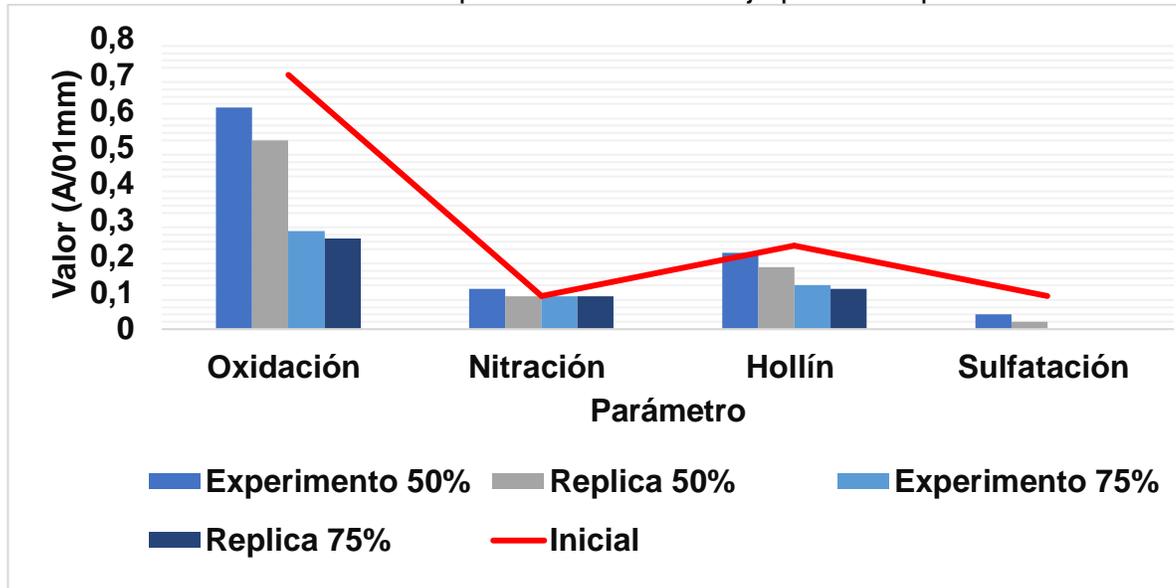
Gráfica 10. Comparación de la norma NTC 5995 con los resultados del experimento 50% inóculo-50% ALU.



Fuente. Elaboración propia.

En la **gráfica 11**, se presentan los resultados de oxidación, nitración, hollín y sulfatación de los experimentos realizados con la cepa D. Los parámetros de oxidación, nitración y hollín de la muestra del 50%, mantuvo valores con nula variabilidad con respecto a la medición inicial. Al comparar los parámetros de la cepa B y D, se obtiene que la cepa B, mejora las propiedades fisicoquímicas del aceite, mediante la detención de generación de radicales alquilo e hidroxilo en el proceso de la oxidación y además facilita que estos compuestos oxidados se liberen de la matriz de hidrocarburos del ALU.

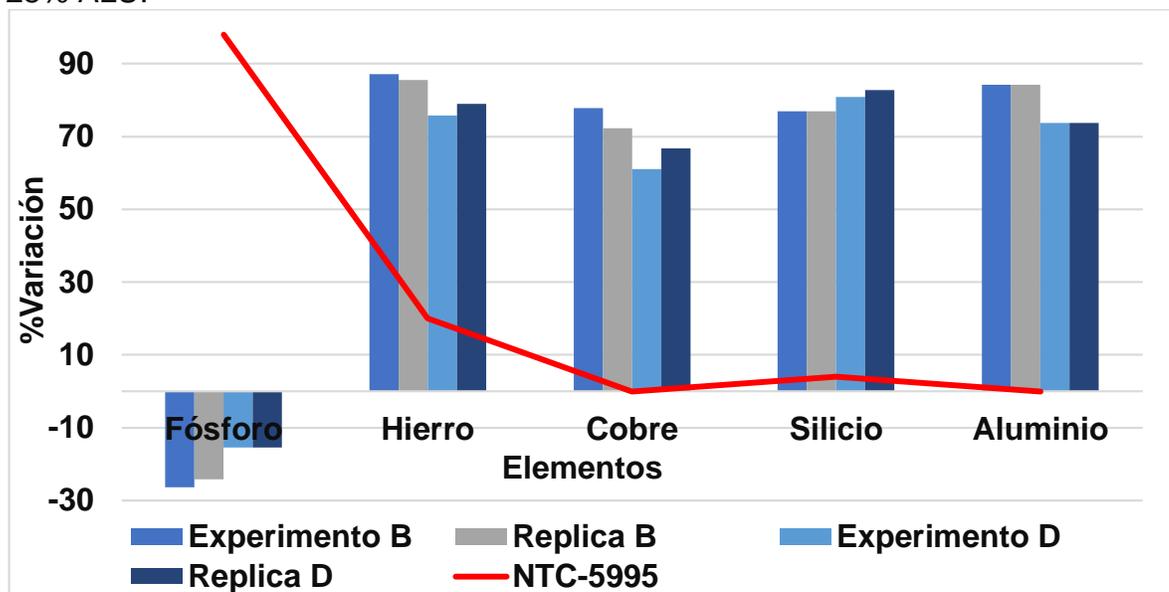
Gráfica 11. Resultados de la espectrometría infrarrojo para la cepa D.



Fuente. Elaboración propia.

Los resultados para los experimentos de 75% inóculo-25% ALU, se presentan en la **gráfica 12**. El fósforo aumenta su concentración en todos los experimentos, esto a raíz de que, en estos 4 tratamientos, la cantidad de medio de cultivo aumento en un 25% v/v con respecto a los experimentos de 50%, y como se presenta en la **tabla 17**, el elemento más abundante en el medio de cultivo es el fósforo. Para la corrección del aumento del fósforo, debe buscarse un agente reductor diferente a la L-cisteína y así no aumentar en más de 20% la concentración de fósforo en el ALU. Se obtuvieron resultados promedio superiores al 70% de remoción en Hierro, Cobre, Silicio y Aluminio.

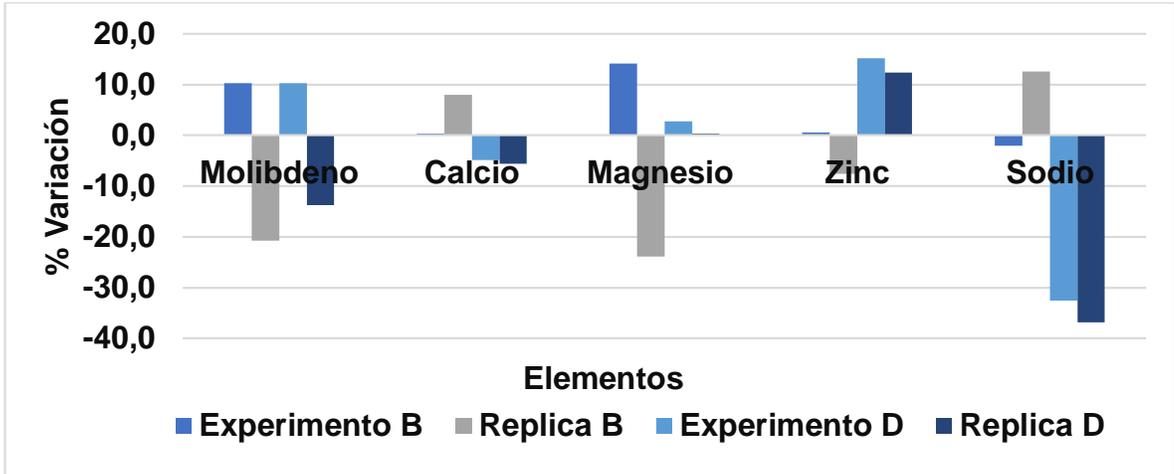
Gráfica 12. Comparación de la norma NTC 5995 con los resultados de 75% inóculo-25% ALU.



Fuente. Elaboración propia.

En la **gráfica 13**, se presenta el porcentaje de variación de los elementos de molibdeno, calcio, magnesio, zinc y sodio en los experimentos de volumen 50% inóculo-50% ALU. El sodio, magnesio y calcio están presentes en el medio de cultivo Postgate C, con lo cual se puede explicar su aumento en la concentración, además el molibdeno es utilizado como estabilizante térmico en los aceites lubricantes. Debido al estrés que se sometió el aceite, los compuestos que lo contenían se desnaturalizaron liberando el metal a la matriz de lubricante, y por la viscosidad de esta, no se precipito a la matriz acuosa del medio.

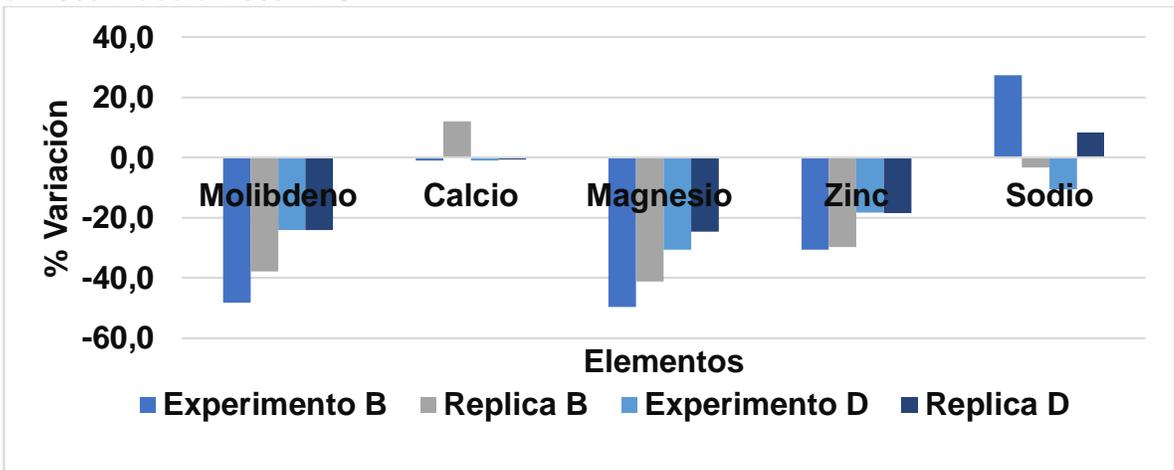
Gráfica 13. Variación de molibdeno, calcio, magnesio, zinc y sodio en experimentos al 50% inóculo-50% ALU.



Fuente. Elaboración propia.

En la **gráfica 14**, se presenta el porcentaje de variación de los elementos de molibdeno, calcio, magnesio, zinc y sodio en los experimentos de volumen 75% inóculo-25% ALU. Los aditivos del ALU sufren un mayor desgaste en presencia de volúmenes altos de agua como es el caso de los experimentos de 75% inóculo-25% ALU, por ello el molibdeno aumento su concentración en promedio un 20% en los 4 experimentos, sumado a ello, un mayor volumen de inóculo genero un aumento en los elementos presentes en el inóculo en la matriz del aceite usado. En Colombia la presencia de estos metales o elementos no se regula para la re-utilización de ALU como bases lubricantes, por lo tanto, no fueron tomados en cuenta en el ANOVA, pero en búsqueda de ampliar esta tecnología debe resolverse, el aumento de molibdeno, calcio, magnesio, zinc y sodio.

Gráfica 14. Variación de molibdeno, calcio, magnesio, zinc y sodio en experimentos al 75% inóculo-25% ALU.



Fuente. Elaboración propia.

Todos los experimentos redujeron la concentración de hierro y silicio, hasta los valores que exige la norma, sin embargo, solo los experimentos 50% inóculo-50% ALU de ambas cepas, lograron reducir la concentración final del fósforo, pero ningún experimento, logro reducir el 98% que se requería para hacerlo apto en cuanto a concentraciones de metales, exigidos por la norma. Las condiciones de 75% de inóculo, tanto para la cepa B y la cepa D, lograron un promedio de remoción de 70%, el cual es menor que el 75% de remoción obtenido por Cibati y otros²¹⁴, pero aumentaron en 20% la concentración final del fósforo. Las condiciones del tratamiento, deben ser determinadas por la caracterización inicial del ALU, de esta manera, y con los resultados mostrados anteriormente, se decide que elementos se busca reducir, y se selecciona la concentración de inóculo que se adapte a esas condiciones de tratamiento, en cuanto a la variación de la cepa, el análisis de varianza, mostró que no es un factor de peso a la hora de realizar el proceso, por lo tanto, la cepa B y D son aptas para llevarlo a cabo.

²¹⁴ CIBATI. Op. cit., p. 2-4.

5. CONCLUSIONES

- Fue posible aislar dos cepas bacterianas (una de las cuales pertenece al género *Clostridium*) aptas para la disminución de azufre y metales pesados en los Aceites Lubricantes Usados de motor Diésel, a partir de una muestra de lodo tomada en el mesotermal “Casablanca”; ambas cepas bacterianas se ajustaron a las condiciones nutricionales y fisicoquímicas suministradas.
- Según el diseño de experimentos planteado, no hubo diferencia significativa entre utilizar la cepa B o la cepa D en el tratamiento biológico de los Aceites Lubricantes Usados de motor Diésel, por lo tanto, ambas cepas son aptas para el mismo.
- La precipitación fue más uniforme y repetible en todos los experimentos llevados a cabo al 50%Inóculo-50%ALU, independientemente de la cepa utilizada, a pesar de que se observó la formación de una mayor cantidad de precipitado en los experimentos llevados a cabo al 75%Inóculo-25%ALU.
- El porcentaje de inóculo resultó ser la variable condicionante del tratamiento biológico y de la cual dependía el comportamiento de la variable respuesta. Los experimentos llevados a cabo al 75%Inóculo-25%ALU, independientemente de la cepa utilizada, exhibieron porcentajes de remoción promedio superiores a 70% en elementos como hierro, silicio, aluminio y cobre, a diferencia de los experimentos llevados a cabo al 50%Inóculo-50%ALU, en los cuales se lograron porcentajes de remoción promedio de hasta 45% en los elementos mencionados. Por otra parte, la cepa B en todos los tratamientos logro disminuir en su totalidad la sulfatación del ALU. Estos resultados corresponden a lo observado en la evaluación cualitativa, a pesar de ello, ningún experimento logró satisfacer la concentración de fósforo requerida por la NTC-5995, y así poder re-utilizar el aceite como base lubricante.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar rezasurina en reemplazo de la L-cisteína como agente reductor del medio de cultivo, pues este último contiene fósforo en su estructura química.
- Se recomienda evaluar la regulación metabólica enzimática de las cepas seleccionadas como aptas para el tratamiento biológico, con el fin de aumentar su velocidad de crecimiento y que a futuro estas mismas lleven a cabo los tratamientos biológicos propuestos con mayor rapidez.
- La investigación se puede continuar construyendo una torre anaerobia empacada de adsorción o de intercambio iónico, pues se demostró que las cepas aisladas generan biopelículas para llevar a cabo el proceso de reducción disimilativa de sulfatos, así que es bastante probable que un aumento en el área de contacto entre la bacteria y el aceite lubricante usado de motor Diésel, aumente la eficiencia del tratamiento biológico.

BIBLIOGRAFÍA

ACHÁ, Dario. HINTELMANN, Holger. YEE, Janet. Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region. En: Chemosphere. Octubre, 2010. 6 p.

ADAM EQUIPMENT. Manual de operación Serie Nimbus NBL [en línea]. 56 p. Disponible en Internet: https://www.adamequipment.com/media/docs/Print%20Publications/Manuals/NBL_UM_ES.pdf

AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES. Resúmenes de Salud Pública – Ácido sulfhídrico (Hydrogen Sulfide) [en Línea]. Atlanta. (6 de mayo de 2016), párrafo.1.1. Disponible en Internet: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs114.html.

AGUDELO LÓPEZ, Sebastián y HERNÁNDEZ BAENA, Diego Andrés. Sistema de recolección de aceites residuales para estaciones de servicio y servitecas, contribuyendo con el cuidado y la preservación del medio ambiente [en línea]. Trabajo de grado para optar por el título de ingeniero mecánico. Medellín. Universidad EAFIT. Área de proyectos, 2006. 164 p. Disponible en Internet: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/021246/021246.htm>

ÁLVAREZ, Sergio. ¿Por qué consumen aceites los coches? Desmontando mitos y resolviendo dudas [en línea]. En: Diario Motor. 1, junio, 2016. Disponible en: <https://www.diariomotor.com/2016/06/01/consumo-aceite-coche/>.

ASOCIACIÓN COLOMBIANA DEL PETROLEO. [En línea]. Informe estadístico petrolero. Bogotá. 2017. Disponible en Internet: <https://acp.com.co/web2017/es/publicaciones-e-informes/informe-estadistico-petrolero>

----- Fondo de Aceites Usados. Ilícito de lubricantes. Bogotá. [En línea]. Junio de 2018. Disponible en Internet: <https://acp.com.co/web2017/es/lubricantes/117-ilicito-de-lubricantes>.

----- Fondo de Aceites Usados. Panorama general del aceite lubricante usado. [Diapositivas]. Bogotá. 2017. 14 diapositivas.

----- Esquema de recolección en la cadena de gestión del aceite usado [en línea]. Bogotá D.C. Colombia, 3, octubre, 2017. Párr. 1 Disponible en: <https://acp.com.co/web2017/es/lubricantes/374-fondo-de-aceites-usados-fau>.

ATLAS, Ronald. Handbook of microbiological media. 4 ed. Washington D.C, CRC press, 2010. 1074 p.

AUDIBERT, Francois. Waste Engine Oils, Rerefining and energy recovery. ELSEVIER. 1 Ed. ISBN: 978-0-444-5202-3. p. 50.

BALDI, F; PEPI, M y FILLIPELLI, M. Methylmercury resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* strains in relation to methylmercury degradation [en línea]. En: Applied and environmental microbiology. Agosto, 1993, 7. p. Vol. 59. ISSN 2479-2485. Disponible en Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16349013>.

BEYENAL H., LEWANDOWSKI Z. (2004) Dynamics of lead immobilization in sulfate reducing biofilms. Water Research 38: 11 p.

BRITANIALAB. Tripteína Soya Agar [en línea]. (noviembre de 2015), párr. 1. Disponible en Internet: http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a297bfd85301.pdf.

CABRERA REVUELTA, Gema. Estudio de procesos para la solubilización y precipitación de iones metálicos contaminantes mediante bacterias azufre oxidantes y sulfato reductoras. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias. Trabajo para optar por el título de PhD en Ingeniería Química. Mayo, 2005. 274 p.

CIBATI, Alessio. CHENG, Ka Yu. MORRIS, Christina. Selective precipitation of metals from synthetic spent refinery catalyst leach liquor with biogenic produced in a lactate fed anaerobic baffled reactor. En: Hydrometallurgy. Julio, 2013. Vol 139, 8 p.

COLLINS, M., ET AL., The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int J Syst Bacteriol, 1994. 44(4): 12 p.

COLOMBIA, MINISTERIO DE MINAS Y ENERGÍA. Instituto de investigación e información geocientífica. Inventario de fuentes termales del departamento de Cundinamarca. Bogotá D.C. 184 p. agosto, 2003.

COLOMBIA. CONGRESO DE LA REPÚBLICA. Ley 253 (17, enero,1996). Por medio de la cual se aprueba el convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación [en línea]. Diario oficial. Bogotá, D.C., 1996. no. 42.688. Disponible en Internet: http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/leyes/1996/ley_0253_1996.pdf

COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Decreto 4741 (30, diciembre, 2005). Por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y el manejo de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral [en línea]. Bogotá D.C.: El ministerio,

2005. Disponible en Internet:
<https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=18718>

COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Gestión de aceites usados en Colombia. 39 diapositivas. Bogotá D.C. Colombia.

-----. Resolución 1446 (5, octubre, 2005). Por la cual se modifica parcialmente la resolución 415 del 13 de marzo de 1998, que establece los casos en los cuales se permite la combustión de aceites de desecho o usados y las condiciones técnicas para realizar la misma [en línea]. Bogotá: El ministerio, 2005. Disponible en Internet: <http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/app/resoluciones/b0-Resoluci%C3%B3n%201446%20de%202005%20-%20Modifica%20Resoluci%C3%B3n%20415%20de%201998.pdf>

-----. Resolución 909 (5, junio, 2008). Por la cual se establecen las normas y estándares de emisión admisibles de contaminantes a la atmósfera por fuentes fijas y se dictan otras disposiciones. [en línea]. Bogotá, 2008. Art. 93. Disponible en Internet: <http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/app/resoluciones/f0-Resoluci%C3%B3n%20909%20de%202008%20-%20Normas%20y%20estandares%20de%20emisi%C3%B3n%20Fuentes%20fijas.pdf>

COLOMBIA. MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE. Resolución 415 (13, mayo, 1998). Por la cual se establecen los casos en los cuales se permite la combustión de los aceites de desecho y las condiciones técnicas para realizar la misma [en línea]. Bogotá, D.C. Disponible en Internet: http://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemas/pdf/Normativa/Resoluciones/res_0415_130598.pdf

COLOMBIA. PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA. Decreto 1609 (31, julio, 2002). Por la cual se reglamenta el manejo y transporte terrestre automotor de mercancías peligrosas por carretera. [en línea]. Bogotá, 2002. Disponible en Internet: <https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?dt=S&i=6101>

COLOMBIA. SECRETARÍA DISTRITAL DE AMBIENTE. Resolución 6982 (27, diciembre, 2011). Por la cual se dictan normas sobre prevención y control de la contaminación atmosférica por fuentes fijas y protección de la calidad del aire. [en línea]. Bogotá, 2011. art. 5. Disponible en Internet: <https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?dt=S&i=45334>

CONRADO MORENO, Vivián; CASTILLO RODRIGUEZ, Francisco; Caballero Dominguez, Francisco Javier; ROLDÁN RUIZ, María Dolores; HUERTAS ROMERA, María José; MARTÍNEZ LUQUE, Manuel y Blasco Plá, Rafael. Biotecnología ambiental [en línea]. 2005. p. 223.

CORPOGEN. Informe de resultados No 1. Bogotá: 2018. 10 p.
D. Thierry and W. Sand. Microbial influenced corrosion. Nueva York, 2002. 950 p.
DOI: 10.1201/b11020-18

DELGADO, Emilio; PARRA, Jaime; AGUILAR, Luisa; GUEVARA, Daniel y NOVOA Jenny. Combustibles alternativos a partir de aceites usados con tratamientos de limpieza [en línea]. En: revista AVANCES. Investigación en Ingeniería. 2007, no. 6. 6 p. Disponible en Internet: www.unilibre.edu.co/revistaavances/avances-6/r6_art11.pdf

DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADÍSTICA. [En línea]. Encuesta anual manufacturera. Bogotá D.C. 2016.

DICORLAB. Frasco tapa rosca azul [en línea]. Disponible en Internet: <http://dicorlab.com/frasco-tapa-rosca-azul-en-vidrio-claro-borosilicato-33/>.

DREYFUS CORTÉS, Georges. Metabolismo bacteriano: El mundo de los microbios [en línea]. México, D.F: (1996). Disponible en Internet: http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/43/html/sec_6.html.

EATON HYDRAULICS TRAINING. Mobil Hydraulic Manual [en línea], 2006, ed. 2. 70 p. Disponible en internet: <http://www.eaton.com/contents-did/3069360/primary-file#apsl0300.pdf>.

ECOPETROL. Monitoreo de la calidad de los combustibles en Colombia. Informe Bogotá [En línea]. 2014. 1 p. Disponible en: https://www.ecopetrol.com.co/documentos/80480_Contenido_de_Azufre_en_Dies_el_Bogot%C3%A11.pdf

EL TIEMPO. [En línea]. Guía técnica y práctica sobre los aceites para motores. En: El Tiempo. Bogotá D.C. 8, septiembre, 2008. Disponible en: <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-4568369>.

ENGINEERS EDGE. Viscosity Index Review [En línea]. Disponible en: https://www.engineersedge.com/lubrication/viscosity_index.htm

------. Viscosity of Hydraulic fluid [En línea]. Disponible en: https://www.engineersedge.com/lubrication/viscosity_index.htm

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Managing used oil, advice for small businesses [en línea]. 1996, Estados Unidos. Disponible en: <https://archive.epa.gov/wastes/conservation/materials/usedoil/web/pdf/usedoil.pdf>. 4 p.

FERGUSSON, Jack E. The heavy elements: Chemistry, Environmental impact, and health effects. 1 ed. Oxford, England: Pergamon Press, 1990. 1 p.

FIGUEROA SALGADO, Simón; SERRANO RICO, Juan y MORENO CONTRERAS, Gonzalo. Mantenimiento predictivo de motores mediante análisis de aceite [en línea]. En: Revista Colombiana de Tecnologías de Avanzada. Universidad de Pamplona, 2009, vol. 1, no. 13, 6 p. Disponible en Internet: http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portallG/home_40/recursos/03_v13_18/revista_13/04112011/12.pdf. ISSN.1692-7257.

FLOREZ PIEDRAHITA, Carlos Arturo. Transformación de los aceites usados para su utilización como energéticos en procesos de combustión. Bogotá, 2001. 5 p.

FOTI, Mirjam. SOROKIN, Dimitry. LOMANS, Bart. Diversity, activity, and abundance of sulfate reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. En: Applied and Environmental Microbiology. Abril, 2007. Vol 7. 8 p.

GARCÍA OROZCO, Gilbert Mauricio. Lubricantes: propiedades, aditivos y tipos [en línea]. Prueba de ruta. Disponible en Internet: <https://www.pruebaderuta.com/lubricantes-propiedades-aditivos-y-tipos.php>.

GÓMEZ ESTRADA, Yesid Antonio. Contribución al desarrollo y mejora para la cuantificación de la degradación en aceites lubricantes usados de MCI A a través de la técnica de espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Tesis para optar por el título de PhD en sistemas de medio de transporte. Valencia, 2013, Universidad Politécnica de Valencia. 265 p.

GUTIÉRREZ, PULIDO, Humberto. SALAZAR, Román de la Vara. Análisis y diseño de experimentos. 2 Ed, McGrawHill, México. 564 p. ISBN-10: 970-10-6526-3.

HERASCIENFIC. Puntas para Pipetas estériles [en línea]. Disponible en Internet: <https://www.herascientific.com/producto/puntas-para-pipetas-esteriles-de-1ml-azules/>

IMLAB S.A.S. Pipetas automáticas (transferpipetas) volumen variable GIANT [en línea]. Disponible en Internet: <http://www.equiposdelaboratorioimlab.com/producto/pipetas-automaticas-transferpipetas-volumen-variable-8011-giant/>

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Compendio de normas para trabajos escritos. NTC 1486.6166. Bogotá D.C.: El instituto, 2018. ISBN 9789588585673 153 p.

------. Gestión ambiental: Calidad del agua. Muestreo. Técnicas generales de muestreo. Bogotá D.C.: El instituto, 1995.

----- . Petróleo y sus derivados. Bases lubricantes re-refinadas.

ISMAIL, Mardhiah. YAHAYA, Nordin. ABU BAKAR, Akrima. Cultivation of sulfate reducing bacteria in different media. Malaysian Journal of Civil Engineering. Disponible en: Research Gate [en línea]. 2014. 10 p.

KAKSONEN, Anna. PLUMB, Jason. ROBERTSON, Wendy. Novel thermophilic Sulfate reducing bacteria from geothermally active underground mine in Japan. En: Applied and Environmental Microbiology. Mayo, 2006. Vol 72, 4 p.

KUMAR PATNAIK, Bhabendra; CHARAN KARA, Tarani; NATH GHOSH, Soumendra y KUMAR DALAI, Abhaya. Textbook of Biotechnology [en línea]. Nueva Delhi: Tata McGraw Hill Education Private Limited. 2012, 28.32 p. ISBN (13) 978-0-07-107007-2, ISBN (10) 0-07-107007-9.

KUPAREVA, Antonia. MAKI-ARVELA, Paivi. Et al. Chemical Characterization of lube oil. Energy and Fuels. ACS Publications. 13, diciembre de 2012. p. 28. DOI: 10.1021/ef3016816. 7 p.

LABBRANDS. Cabina Flujo laminar vertical Streamline – Esco [en línea]. Disponible en Internet: http://www.labbrands.com/vertical/975-cabina-flujo-laminar-vertical-streamline-esco.html#data_sheet

LEAL HERRERA, Edgar Leandro y PEÑA RUIZ, Victoria Alejandra. Evaluación de tecnologías aplicadas a la recuperación de aceites gastados para el rendimiento de los motores de gasolina [en línea]. Trabajo especial de grado para optar por el título de Ingeniero Químico. Maracaibo. Universidad Rafael Urdaneta. Facultad de Ingeniería. Escuela de ingeniería química, 2009. 82 p. Disponible en Internet: <http://200.35.84.131/portal/bases/marc/texto/2101-09-02934.pdf>

LEBORIZ. Frascos para muestras [en línea]. Disponible en Internet: <https://www.leboriz.com/catalogo/fungible/frascosparamuestras.pdf>.

LENS, P.N.L y KUENEN, J.G. The biological sulphur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology [en línea]. En WaterSciTechnol, vol 44, 10 p. Disponible en internet: https://www.researchgate.net/publication/11626182_The_biological_sulfur_cycle_Novel_opportunities_for_environmental_biotechnology.

LEWIS Alison. Review of metal sulphide precipitation [en línea]. Prospectiva, vol. 104, 13 p. Disponible en internet: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304386X10001775>.

LI, Qiang. WANG, Cong. *et al.* Isolation of *Thiobacillus spp* and it's application in the removal of heavy metals from activated sludge. Key laboratory of molecular

microbiology and technology for ministry of education. Nankai University. 29, noviembre, 2012. ISSN: 1684-5315. p.2.

LÓPEZ GUAIMACUTO, Pedro y FUENTES, José Luis. Las bacterias sulfato – reductoras [en línea]. En: Geominas. Agosto, 2015, vol. 43, no. 67, 6 p. Disponible en Internet: https://www.researchgate.net/profile/Pedro_Lopez21/publication/309322176_Las_bacterias_sulfato-reductoras_The_sulfate-reducing_bacteria_As_bacterias_sulfato-reductoras/links/580a01f408ae45e02c0d626c/Las-bacterias-sulfato-reductoras-The-sulfate-reducing-bacteria-As-bacterias-sulfato-reductoras.pdf.

LÓPEZ MARTÍNEZ, N Y TRUYOLS SANTOJA, J. Paleontología: Conceptos y métodos. España: síntesis, 1994. 334 p. ISBN: 84-7738-249-2.

LOVLEY, D, R. RODEN, E, E. PHILIPPS, E, J, P. and WOODWARD, J, C. 1993, Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria, Marine Geol. p. 13 p.

LUBRICANTES GULF. Manual técnico [en línea]. Buenos Aires (Argentina): 35 p. Disponible en Internet: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:aAOeXr_oBUUJ:remex.com.ar/descargas_web/1-1%2520Gulf%2520-%2520Manual%2520Tecnico%2520de%2520Lubricantes.pdf+%&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=co

MACFADDIN. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3 Ed, Montevideo, Uruguay. 2003. 850 p.

MARTÍN PANTOJA, José Luis. La gestión de los aceites usados [en línea]. Madrid (España): Escuela de Organización Industrial, 2008, 60 p. Disponible en Internet: www.eoi.es/es/file/18223/download?token=mqjpBqGp.

MASERATIGRANTURISMO. [En línea]. ¿Carro viejo de carburador en lugar de inyección? En: El Tiempo. Bogotá D.C. 26, marzo, 2015. Disponible en: <http://blogs.eltiempo.com/todo-sobre-autos/2015/03/26/carro-viejo-de-carburador-en-lugar-de-inyeccion-analisis-y-cuidados/>.

MICROSOFT EXCEL, versión 2014.

MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Manual técnico para el manejo de Aceites Lubricantes Usados de origen automotor e industrial. [en línea]. 2 ed. Bogotá (Colombia), 2014. 78 p. ISBN: 978-958-8491-87-5. Disponible en Internet: <https://acp.com.co/web2017/images/pdf/combustiblesylubricantes/FAU/Manual-AU-final-14.pdf>.

------. Programas voluntarios de recolección posconsumo [en línea]. Bogotá D.C, Colombia. Párr. 1. Disponible en: <http://www.minambiente.gov.co/index.php/normativa/10-asuntos-ambientales-y-sectorial-y-urbana/asuntos-ambientales-y-sectorial-y-urbana-articulos/189-plantilla-asuntos-ambientales-y-sectorial-y-urbana-17>.

MINISTERIO DE TRANSPORTE. Estadísticas del RUNT: Parque automotor registrado en el RUNT [En línea]. Disponible en: https://www.runt.com.co/cifras?field_fecha_de_la_norma_value%5Bvalue%5D%5Byear%5D=2017&field_grafica_value=5

MKS. Technical note: Introduction to FTIR Spectroscopy [En línea]. Newport. 2015. Disponible en: <https://www.newport.com/b/mks-instruments>.

MOBIL, Catálogo de lubricantes.

NORIA LATIN AMÉRICA. Grados de viscosidad SAE para lubricantes de motor [en línea]. Lublearn. (21 de noviembre de 2013), párr. 6. Disponible en Internet: <http://noria.mx/lublearn/entendiendo-los-grados-de-viscosidad-sae-para-lubricantes-de-motor/>

------. Punto de inflamación de un aceite [en línea]. Lublearn. (21 de noviembre de 2014), párr. 3. Disponible en Internet: <http://noria.mx/lublearn/defina-que-es-el-punto-de-inflamacion-de-un-aceite/>

NUÑEZ, María Eugenia. Aceite usado generado por motores en la ciudad de Cali. Alternativas de uso [en línea]. En: revista de Subproductos Industriales de Colombia. 8 p. Disponible en Internet: <http://www.ingenieroambiental.com/4014/motores.pdf>

NUTRIENTES Y gases [Anónimo]. Tercera parte. 24 p. Disponible en Internet: <https://sistemamid.com/preview/nutrientes-y-gases-p3-azufre-pdf>.

OKABE, S, CHARAKLIS, W. G. Effects of temperature and phosphorous concentration on Microbial Sulfate Reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*. Biotechnology and Bioengineering, Ed,39, 11 p.

OLADE. Organización Latinoamericana de Energía, ICEL, geotérmica italiana S.R.L AND CONTECOL.1982. Estudio de reconocimiento de los recursos Geotérmicos de la República de Colombia. 184 p.

OMNITEK. Automatic Houillon: Kinematic viscometry system for petroleum products [En línea]. Waddinvenn. 2017. 45 p. Disponible en: https://www.parkessscientific.com/wpcontent/uploads/2016/02/Sflow_brochure_V1.2_.pdf.

OREMLAND, Ronald; CULBERTSON, Charles y Winfrey, Michael. Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation [en línea]. En: Applied and Environmental Microbiology. Enero, vol 57 no. 1, 7 p. ISSN 0099-2240. Disponible en Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182673/pdf/aem00054-0152.pdf>.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Intoxicación por plomo y salud [En línea]. Agosto, 2018. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>

ORTIZ MEDINA, Oscar Leonardo. Evaluación de la gestión integral del manejo de aceite usado vehicular en Bogotá [en línea]. Trabajo de grado para optar por el título de máster en gestión ambiental. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de estudios ambientales y rurales. Bogotá, 2007. 134 p. Disponible en Internet: observatorio ambiental de Bogotá. <http://oab.ambientebogota.gov.co/es/con-la-comunidad/ES/evaluacion-de-la-gestion-integral-del-manejo-de-aceite-usado-vehicular-en-bogota-br>.

OXOID. Anaerogen [en línea]. Disponible en Internet: http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/Anaerogen_AN0035A%20AN0025A_spanish.pdf.

------. Sistemas Generadores de Atmósferas [en línea]. Disponible en Internet: <http://www.analisisavanzados.com/index.php/anaerobiosis>

PÉREZ DE CASTRO, Ana María. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) [en línea]. RiuNet repositorio UPV. Valencia. (11 de abril de 2011), 10 p. Disponible en Internet: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>.

PEREZ GALERA, José Antonio. Clasificación de los aceites lubricante. Clasificación "SAE". [en línea]. EDUCARM. España. 9 p. Disponible en internet: www.educarm.es/templates/portal/ficheros/websDinamicas/21/clasifica_sae.doc

------. Los aceites lubricantes [en línea]. Publicaciones didácticas. (Julio de 2015), Disponible en Internet: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:j8jKW_yzbr4J:www.educarm.es/templates/portal

RED OPERATIVA DE DESGUACES ESPAÑOLES. ¿Qué es el sistema de transmisión? [en línea]. párr. 7. Disponible en Internet: <https://www.ro-des.com/mecanica/que-es-el-sistema-de-transmision/>.

RODRÍGUEZ, Patricia y ARENAS, Roberto. Hans Christian Gram y su tinción [en línea]. En: Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. 2018, vol. 16, no. 2. 2 p. Disponible en Internet: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>.

S. Y. Li, Y. G. Kim; K. S. Jeon, Y. T. Kho y T. Kang. Microbiologically influenced corrosion of carbon steel exposed to anaerobic soil. Korea, 2011. 14 p.

SADANA, J.C Y RITTENBERG, D. Iron requirement for the hydrogenase of *Desulfovibrio desulfuricans*. En: Biochemistry, biophysics. 1964. vol. 108. 3 p.

SALDIVIA, Francisco. Aplicación de mantenimiento predictivo. Caso estudio: análisis de aceite usado en un motor de combustión interna [en línea]. En: memorias de la undécima conferencia de ingeniería y tecnología en Latinoamérica y el caribe. Innovación en ingeniería, tecnología y educación para la competitividad y prosperidad. Agosto 14 – 16 de 2013, 10 p. Disponible en Internet: <http://laccei.org/LACCEI2013-Cancun/RefereedPapers/RP264.pdf>.

SÁNCHEZ, Rita Samanta. Distribución de bacterias sulfato reductoras y metilmercurio en sedimentos de lagunas de inundación del río Beni, Amazonia Boliviana. Tesis para optar el título de magister en ciencias biológicas. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. 2005. 114 p.

SERNA, Marilyn y BARRERA, Isabel. Plan y estructura de Ventas Global Oíl aceites y lubricantes. Trabajo de grado Gerencia de ventas. Bogotá D.C. Universidad Externado de Colombia. Facultad de administración. Departamento de Gerencia de Ventas, 2017. 55 p.

SILVA FONG, Waldyr. BOLAÑOS, Edgar. TOVAR, Candelaria. Caracterización físico-química de aceites usados de motores para su reciclaje. Facultad de ingeniería, Universidad de Cartagena. Vol. 15, 2017, 10 p.

SMILLIE, R.H; HUNTER, K y LOUITIT, Margaret. Reduction of chromium (VI) by bacterially produced hydrogen sulphide in a marine environment [en línea]. En: Water Research. 1981, vol 15, 4 p. Disponible en Internet: <https://ezproxy.uamerica.edu.co:2119/science/article/abs/pii/0043135481900075>.

STACKEBRANDT, E., et al., Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1997 Oct; 47(4): 5 p.

STANDARD TEST METHOD. Acid Number of petroleum products by potentiometric titration. Julio, 2018. DOI: 10.1520/D0664-18E02. 11 p.

------. Base number of petroleum products by potentiometric perchloric acid titration. Mayo, 2017. DOI: 10.1520/D2896-15. 9 p.

------. STANDARD TEST METHOD. Determination of wear metals and contaminants in used lubricating oils or used hydraulic fluids by rotating disc electrode atomic emission spectrometry. Designación: D6595-17. Mayo, 2017. DOI: 10.1520/D6595-17. 6 p.

SVENSKA STATOIL AB. Hydraulic fluids [En línea]. Noviembre, 2018. 14 p. Disponible en:
https://www.oil.sk/storage/file/products/catalogs/statoil/hydraulic_fluids_folder.pdf

TOERIEN, D. THIEL, P. HATTINGH, M. Enumeration, insolation and identification of sulphate reducing bacteria of anaerobic digestion. National Institute for Water Research. Disponible en Science Direct [en línea]. 2 vol, 1968, 9 p.

TORBACKE, Marika. RUDOLPHI, Asa. KASSFELDT y Elisabeth. Lubricants, Introduction to properties and performance. India, 2014. 219 p. ISBN 9781118799741.

TORMOS, Bernardo. Diagnóstico de motores Diésel mediante el análisis de aceite usado [en línea]. España: editorial reverté, S.A, 2005. 373 p. ISBN 84-291-4702-0. Disponible en Internet:
https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=DqJuqL_UzjkC&oi=fnd&pg=PA1&dq=aceites+lubricantes+usados&ots=kHaEfggCo_&sig=WDqhKMwEJdc14oCp2HoNlRiC2yM#v=onepage&q&f=false.

TUTTNAUER. Autoclaves médicas EA/EKA Clase S [en línea]. Disponible en Internet: <https://es.tuttbauer.com/autoclaves-m%C3%A9dicas/autoclaves-de-mesa/autoclaves-clase-s-clase-n/ea-y-eka>

TOTAL. Cambio del líquido de transmisión. [en línea]. Chile), párr. 2. Disponible en Internet: <http://www.total-chile.cl/tips/cambio-de-aceite/cambio-del-liquido-de-transmision.html>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO. Manual de prácticas de laboratorio inocuidad alimentaria [en línea]. México 27 p. Facultad de Medicina. Disponible en Internet:
http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_971_MP%20Inocuidad%20Alimentaria.pdf

UNIVERSIDAD DE GRANADA. Preparación de medios de cultivo [en línea]. España. 5 p. Disponible en Internet:
<https://www.ugr.es/~cjl/medios%20de%20cultivo.pdf>

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO. Secuenciación del ADN [en línea]. ehu. España. 6 p. Disponible en Internet: http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/bioinf/pdf/tema_2a.pdf.

VICENTE, Mariana Soledad. Uso de bacterias sulfato – reductoras inmovilizadas para la precipitación de metales pesados [en línea]. Argentina. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. 2006. 61 p. Disponible en Internet: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2191/Documento%20completo.pdf?sequence=1>.

WIDMAN INTERNATIONAL SRL. ¿Qué es la viscosidad? [en línea]. Santa cruz. (10 de julio de 2018), párr. 3. Disponible en Internet: <http://www.widman.biz/Seleccion/viscosidad.html>

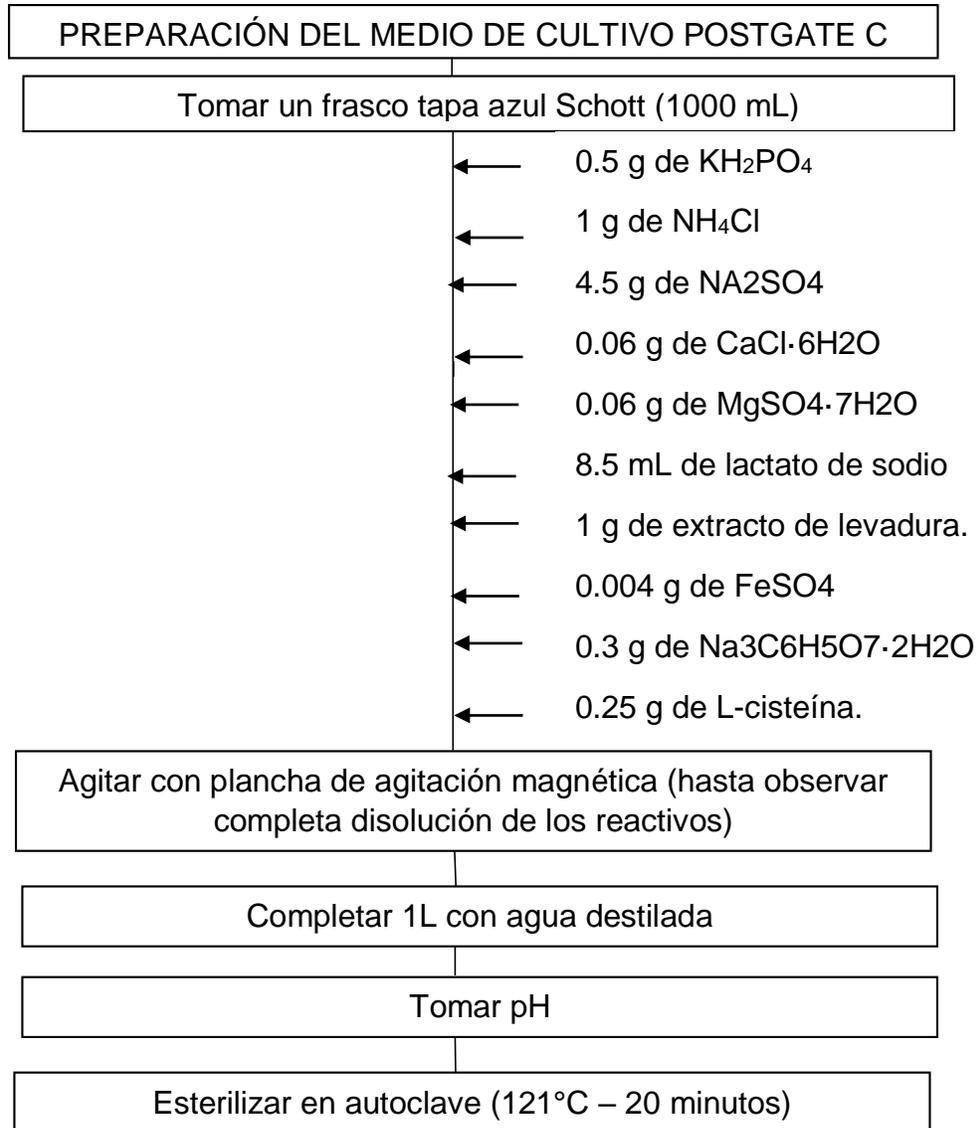
WIDMAN INTERNATIONAL SRL. Cómo Seleccionar un Aceite para la Transmisión Manual [en línea]. Santa cruz. (10 de julio de 2018), párr. 1. Disponible en Internet: <https://www.widman.biz/Seleccion/manual.html>

----- SAE J300 [en línea]. Santa cruz. (10 de julio de 2018), párr.4. Disponible en Internet: <https://www.widman.biz/Seleccion/j300.html>

ZOGBI. Filtros de celulosa. [en línea]. Disponible en Internet: <http://www.dczogbi.com/filtros.html>

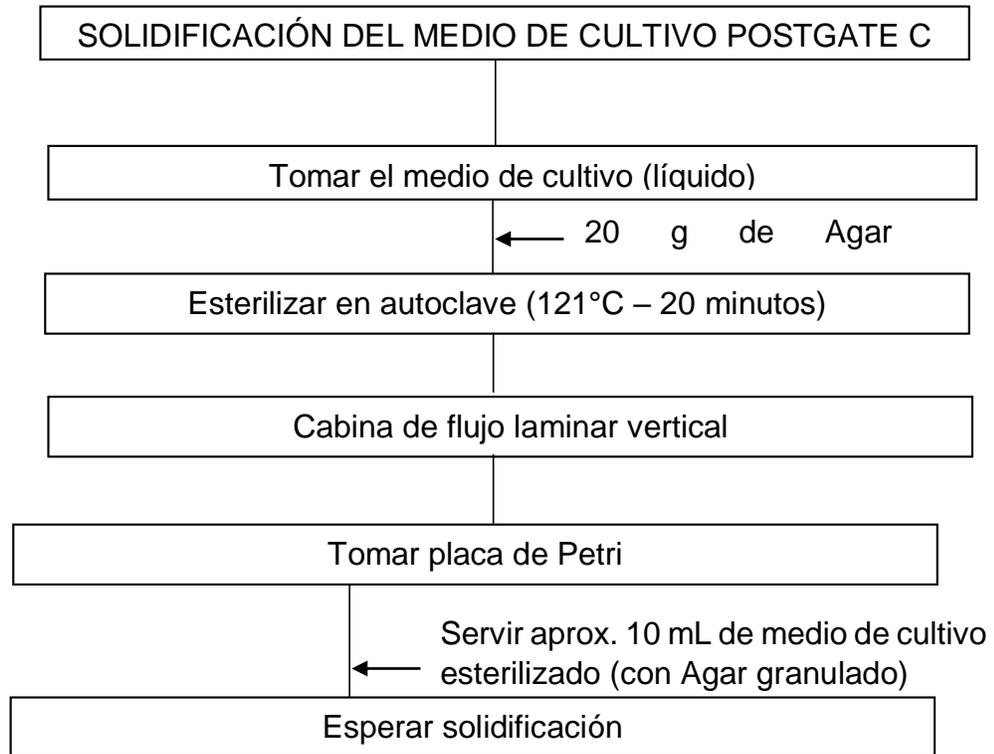
ANEXOS

Anexo A.
**PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO
POSTGATE C.**



Fuente. Elaboración propia.

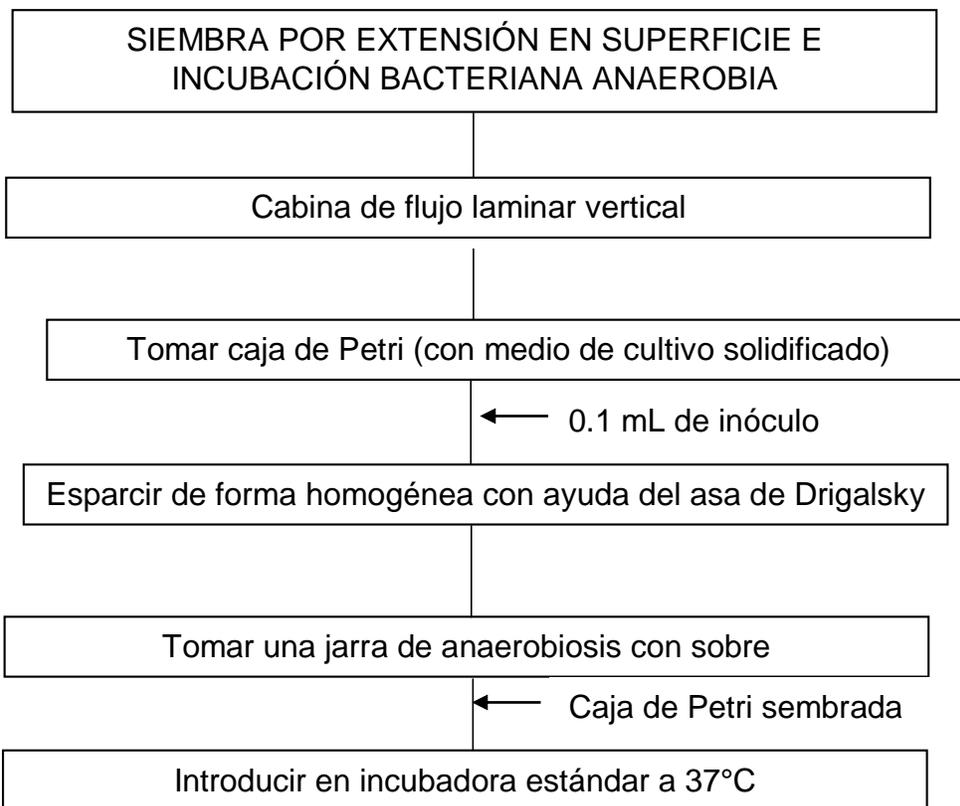
Anexo B.
**PROCEDIMIENTO PARA LA SOLIDIFICACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO
POSTGATE C.**



Fuente. Elaboración propia.

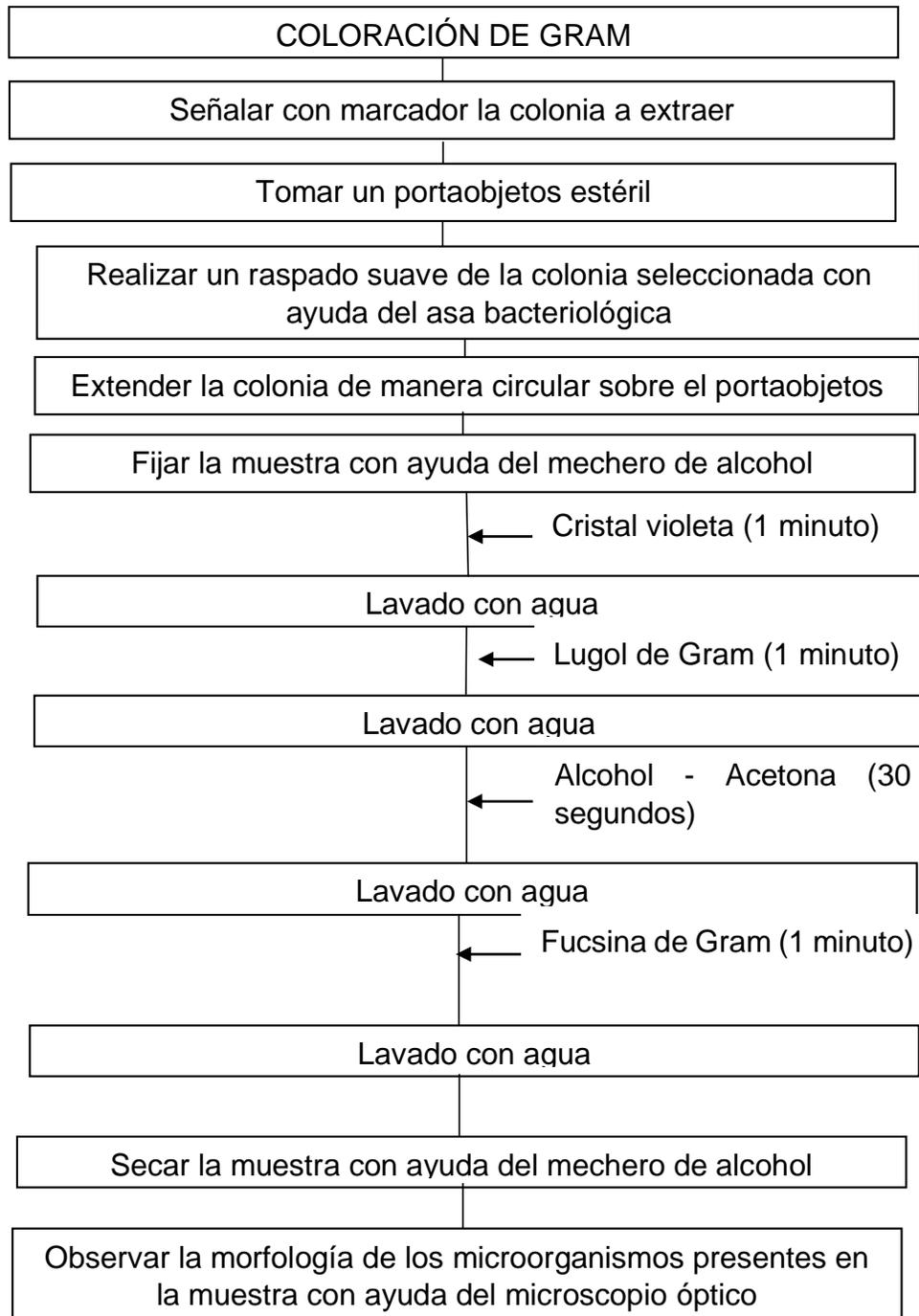
Anexo C.

Procedimiento de siembra por extensión en superficie e incubación bacteriana anaerobia.



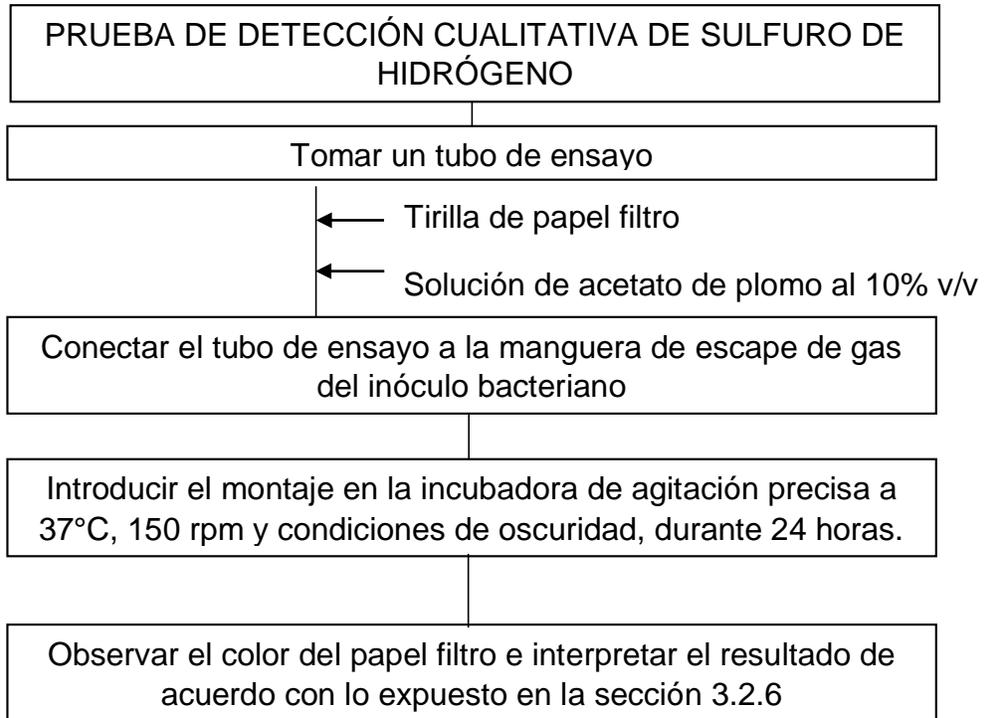
Fuente. Elaboración propia.

Anexo D.
PROCEDIMIENTO PARA LA COLORACIÓN DE GRAM.



Fuente. Elaboración propia.

Anexo E.
PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA DE DETECCIÓN CUALITATIVA DE
SULFURO DE HIDRÓGENO



Fuente. Elaboración propia.

Anexo F.
INSTRUMENTOS DE LABORATORIO UTILIZADOS DURANTE LA
EXPERIMENTACIÓN

Instrumento	Descripción	Ilustración
Frascos para muestras con tapón	Fabricados en polipropileno de alta transparencia, cuentan con un tapón de polietileno y un cierre hermético ²¹⁵ que permitió mantener las muestras de agua y lodo termal libres de agentes contaminantes externos.	
Nevera de Icopor	Fabricada en poliestireno expandido, con capacidad de 3 L. Se utilizó para mantener la cadena de frío requerida para el transporte de las muestras bacteriológicas (agua y lodo termales).	
Gel refrigerante	Bolsas de gel de hidroxietilcelulosa, utilizadas para refrigerar las muestras bacteriológicas (agua y lodo termales) durante su transporte al laboratorio.	
Frascos tapa rosca azul	Fabricados en vidrio borosilicato de clase 3.3, cuenta con anillo de vertido y tapa de rosca en polipropileno azul. Volumétricamente graduado y completamente autoclavable ²¹⁶ . Marca SIMAX. Fueron utilizados para esterilizar el medio de cultivo y el aceite usado de motor Diésel, además sirvieron como recipiente de contención del inóculo bacteriano.	
Placas de Petri	De dimensiones 90 x 15 mm. Permitieron la siembra e incubación de las bacterias aisladas.	
Matraz de Erlenmeyer con tapón	Marca PYREX. Se utilizó como recipiente para filtrar el aceite usado y para llevar a cabo el tratamiento biológico.	

²¹⁵ LEBORIZ. Frascos para muestras [en línea]. Disponible en Internet: <https://www.leboriz.com/catalogo/fungible/frascosparamuestras.pdf>.

²¹⁶ DICORLAB. Frasco tapa rosca azul [en línea]. Disponible en Internet: <http://dicorlab.com/frasco-tapa-rosca-azul-en-vidrio-claro-borosilicato-33/>.

ANEXO F. (Continuación).

Instrumento	Descripción	Ilustración
Micropipeta	Pipeta automática de volumen variable con alta precisión, completamente autoclavable ²¹⁷ . Marca Accumax. Fue utilizada para completar el volumen de los reactivos requeridos en el tratamiento biológico (inóculo, aceite usado y lactato de sodio).	
Jarra para anaerobiosis	Recipiente de policarbonato con capacidad de 2.5 L (12- 13 placas de Petri) ²¹⁸ . Marca OXOID. Utilizado para generar una atmósfera libre de oxígeno, apta para la incubación de los cultivos en medio sólido.	
Asa de Drigalsky	Varilla de vidrio con punta triangular que facilitó la siembra por extensión en superficie de las muestras bacteriológicas.	
Puntas azules	Puntas estériles de polipropileno azul, adaptables a la micropipeta Accumax. Completamente autoclavables, libres de RNSA y DNSA ²¹⁹ . Permitió tomar el volumen necesario de los reactivos utilizados durante la experimentación, evitando la contaminación de las muestras con posibles microorganismos presentes en la micropipeta.	

²¹⁷ IMLAB S.A.S. Pipetas automáticas (transferpipetas) volumen variable GIANT [en línea]. Disponible en Internet: <http://www.equiposdelaboratorioimlab.com/producto/pipetas-automaticas-transferpipetas-volumen-variable-8011-giant/>

²¹⁸ OXOID. Sistemas Generadores de Atmósferas [en línea]. Disponible en Internet: <http://www.analisisavanzados.com/index.php/anaerobiosis>

²¹⁹ HERASCIENTIFIC. Puntas para Pipetas estériles [en línea]. Disponible en Internet: <https://www.herascientific.com/producto/puntas-para-pipetas-esteriles-de-1ml-azules/>

ANEXO F. (Continuación).

Instrumento	Descripción	Ilustración
<p>Mechero de alcohol</p>	<p>Utilizado para generar condiciones estériles de trabajo y fijar las muestras bacterianas sobre el portaobjetos.</p>	
<p>Asa bacteriológica</p>	<p>Varilla de platino iridiado. Posee una punta circular que facilitó el aislamiento de las colonias bacterianas presentes en los cultivos mixtos.</p>	
<p>Tubos de ensayo con tapa rosca</p>	<p>Marca BRIXCO, completamente autoclavables. Utilizados como recipiente para llevar a cabo la prueba de detección cualitativa de ácido sulfhídrico.</p>	
<p>Portaobjetos</p>	<p>Utilizados para llevar a cabo la técnica de coloración de Gram.</p>	
<p>Filtros de celulosa</p>	<p>Marca Whatman, retienen partículas por encima de los 2.5 μm^{220}. Útiles para fijar la solución de acetato de plomo en la prueba de detección cualitativa de ácido sulfhídrico y para la filtración del aceite usado de motor Diésel.</p>	
<p>Manguera industrial</p>	<p>Fabricada en policloruro de vinilo de alta resistencia, posee un diámetro de 1/4" y fue acoplada a los tapones de los matraces de Erlenmeyer utilizados en el tratamiento biológico de los aceites usados, como vía de escape del gas generado por las bacterias allí presentes.</p>	

²²⁰ ZOGBI. Filtros de celulosa. [en línea]. Disponible en Internet: <http://www.dczogbi.com/filtros.html>

ANEXO F. (Continuación).

<p>Embudo de decantación</p>	<p>Permitió separar el cultivo bacteriano del aceite usado de motor Diésel tratado biológicamente.</p>	
<p>Sobre de anaerobiosis</p>	<p>Sobre de papel que contiene ácido ascórbico en su interior. Marca Thermo scientific. Reduce el nivel de oxígeno de la jarra de anaerobiosis por debajo del 1% en 30 minutos²²¹, generando así la atmósfera requerida para la incubación bacteriana anaerobia en medio sólido.</p>	
<p>Embudo Büchner</p>	<p>Fabricado en porcelana. Junto con el filtro de celulosa y la bomba de vacío permitió filtrar los contaminantes de mayor tamaño presentes en las muestras de aceite usado de motor Diésel.</p>	

Fuente. Elaboración propia basada en fuentes bibliográficas.

²²¹ OXOID. Anaerogen [en línea]. Disponible en Internet: http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/Anaerogen_AN0035A%20AN0025A_spanish.pdf

Anexo G.
EQUIPOS UTILIZADOS DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN.

Equipo	Descripción	Ilustración
Refrigerador industrial	Se mantuvo a 4°C durante la experimentación, con el fin de detener temporalmente las reacciones metabólicas de los microorganismos de interés.	
Balanza analítica Nimbus®	Sistema de pesaje. Posee una legibilidad de 0.0001g, cuenta con display LCD, cabina y anillo de vidrio con tapa de aleación ²²² .	
Plancha de calentamiento y agitación magnética	Marca Daihan Scientific – WISD. Utilizada para la preparación del medio de cultivo solidificado con agar granulado y para la evaporación del agua y volátiles presentes en las muestras de aceite usado de motor Diésel.	
Autoclave	Marca Tuttnauer, modelo 3850 EA. Cuenta con una cámara en acero inoxidable, capacidad de 64 L y un filtro de aire de 0.2 µm HEPA ²²³ que garantiza aire estéril en cada ciclo. Fue utilizada para llevar a cabo los ciclos de esterilización de los materiales y reactivos utilizados en los procedimientos bacteriológicos.	

²²² ADAM EQUIPMENT. Manual de operación Serie Nimbus NBL [en línea]. Disponible en Internet: https://www.adamequipment.com/media/docs/Print%20Publications/Manuals/NBL_UM_ES.pdf

²²³ TUTTNAUER. Autoclaves médicas EA/EKA Clase S [en línea]. Disponible en Internet: <https://es.tuttnauer.com/autoclaves-m%C3%A9dicos/autoclaves-de-mesa/autoclaves-clase-s-clase-n/ea-y-eka>

ANEXO G. (Continuación).

Equipo	Descripción	Ilustración
Cabina de flujo laminar vertical	Aseguró un ambiente estéril en los procedimientos bacteriológicos y en el montaje del tratamiento biológico de los aceites usados. Marca ESCO. Cuenta con una velocidad promedio de flujo de aire de 0.35 m/s, filtro HEPA H13, pre filtro de poliuretano ²²⁴ y una lámpara UV que elimina posibles microorganismos remanentes en la superficie de trabajo. Cumple con los estándares de protección de la norma ISO 9001.	
Incubadora de agitación precisa	Proporcionó las condiciones necesarias de temperatura y agitación orbital, durante el tratamiento biológico de los aceites usados. Marca Daihan Scientific - WISD, modelo thermostable IS - 20R.	
Microscopio óptico vertical	Microscopio binocular con iluminación LED, posee lentes con aumentos de 4X, 10X, 40X y 100X. Marca ZEISS, modelo Primo Star. Fue utilizado para determinar la morfología de las bacterias aisladas.	
Incubadora estándar	Proporcionó las condiciones necesarias de temperatura y oscuridad, durante el aumento de la población bacteriana en medio sólido. MARCA DiEs.	

²²⁴ LABBRANDS. Cabina Flujo laminar vertical Streamline – Esco [en línea]. Disponible en Internet: http://www.labbrands.com/vertical/975-cabina-flujo-laminar-vertical-streamline-esco.html#data_sheet

<p>Bomba de vacío</p>	<p>Utilizada junto con el embudo Büchner, el filtro de celulosa y la manguera industrial, para realizar la filtración al vacío de los contaminantes de mayor tamaño presentes en el aceite usado. Cuenta con un manómetro que permite verificar la generación de vacío en el matraz de Erlenmeyer.</p>	
<p>Bactoincinerador</p>	<p>Quemador de asas bacteriológicas marca LABSCIENT, modelo HY800. Utilizado para esterilizar asas bacteriológicas mediante calor e infrarrojo, en los procedimientos de aislamiento bacteriano y de inoculación de colonias en medio líquido.</p>	

Fuente. Elaboración propia basada en fuentes bibliográficas.

Anexo H.

REACTIVOS UTILIZADOS DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN.

Reactivo	Descripción
Agua destilada	Utilizada como solvente en el medio de cultivo y en la solución de acetato de plomo.
Cloruro de amonio	Aporta macronutrientes al medio de cultivo.
Sulfato de sodio	Aporta macronutrientes y aceptores de electrones al medio de cultivo.
Sulfato ferroso	Aporta macronutrientes, cofactores metálicos y aceptores de electrones al medio de cultivo.
Extracto de levadura	Aporta factores de crecimiento al medio de cultivo.
Fosfato di potásico	Aporta macronutrientes y cofactores metálicos al medio de cultivo.
Citrato de sodio di - hidratado.	Aporta cofactores metálicos al medio de cultivo.
Cloruro de calcio hexa - hidratado	Aporta macronutrientes y cofactores metálicos al medio de cultivo.
Sulfato de magnesio heptahidratado	Aporta macronutrientes, cofactores metálicos y aceptores de electrones al medio de cultivo.
Lactato de sodio	Fuente de carbono del medio de cultivo.
L – cisteína	Agente reductor del medio de cultivo.
Agar granulado	Agente solidificante del medio de cultivo.
Cristal violeta	Colorante utilizado en la tinción de Gram.
Lugol de Gram	Fijador mordiente en la coloración de Gram.
Alcohol – acetona	Decolorante en la tinción de Gram.
Fucsina de Gram	Colorante de contraste utilizado en la tinción de Gram.
Acetato de plomo (10% v/v)	Utilizado en la prueba cualitativa de ácido sulfhídrico.
Aceite mineral	Generó la atmósfera libre de oxígeno requerida para la incubación del inóculo.
Aceite de inmersión	Aumentó la resolución del objetivo en el microscopio óptico.
Etanol (98% v/v)	Utilizado para mantener la asepsia en los lugares de trabajo y como material combustible en el mechero de alcohol.
Hipoclorito de sodio (4.5% p/v)	Bactericida y fungicida.

Fuente. Elaboración propia.

Anexo I.
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA INICIAL DEL ALU.

RESULTADO	
Muestra N°	CO108085
Nombre Aceite Lubricante	MOBIL DELVAC MX 15W40
Fecha de toma de muestra	17/09/2018
Equipo (km/h)	0
Aceite (km/h)	0
Relleno (L)	0
Cambio de Aceite (S / N)	N
Aspecto	
Apariencia	OSCURA
Viscosidad ASTM D7279	
Viscosidad 100°C cSt(mm)	6.2
FT-IR (Infra-Red) E 2412	
Oxidación A/0.1 mm	0.70
Nitración A/0.1 mm	0.09
Hollín A/0.1 mm	0.23
Sulfatación A/0.1 mm	0.09
Glicol %	0.00
Agua %	0.00
Fuel %	4.63
Espectrometría ASTM D6595	
Calcio (Ca) ppm	1154
Magnesio (Mg) ppm	552
Molibdeno (Mo) ppm	29
Fósforo (P) ppm	785
Zinc (Zn) ppm	821
Boro (B) ppm	4
Silicio (Si) ppm	52
Sodio (Na) ppm	95
Aluminio (Al) ppm	19
Cromo (Cr) ppm	3
Cobre (Cu) ppm	18
Hierro (Fe) ppm	62
Plomo (Pb) ppm	2
Manganeso (Mn) ppm	1
Níquel (Ni) ppm	1
Plata (Ag) ppm	0
Estaño (Sn) ppm	0
Titanio (Ti) ppm	1
Vanadio (V) ppm	0
Bario (Ba) ppm	0
TAN ASTM D664	
TAN mgKOH/g	2.15
TBN ASTM D 2896	
TBN mgKOH/g	6.0

Fuente. SGS COLOMBIA.

Anexo I.
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ALU TRATADO POR MEDIO DEL
EXPERIMENTO AL 50% CON LA CEPA B.

RESULTADO	
Muestra N°	CO112212
Nombre Aceite Lubricante	MOBIL DELVAC MX 15W40
Fecha de toma de muestra	22/10/2018
Equipo (km/h)	0
Aceite (km/h)	0
Relleno (L)	0
Cambio de Aceite (S / N)	N
Aspecto	
Apariencia	OSCURA
Viscosidad ASTM D7279	
Viscosidad 100°C cSt(mr)	IMP
FT-IR (Infra-Red) E 2412	
Oxidación A/0.1 mm	0.40
Nitración A/0.1 mm	0.11
Hollín A/0.1 mm	0.15
Sulfatación A/0.1 mm	0.00
Glicol %	0.00
Agua %	0.20
Fuel %	5.64
Espectrometría ASTM D6595	
Calcio (Ca) ppm	1150
Magnesio (Mg) ppm	474
Molibdeno (Mo) ppm	26
Fósforo (P) ppm	700
Zinc (Zn) ppm	817
Boro (B) ppm	1
Silicio (Si) ppm	26
Sodio (Na) ppm	97
Aluminio (Al) ppm	9
Cromo (Cr) ppm	1
Cobre (Cu) ppm	10
Hierro (Fe) ppm	22
Plomo (Pb) ppm	1
Manganeso (Mn) ppm	1
Níquel (Ni) ppm	0
Plata (Ag) ppm	0
Estaño (Sn) ppm	0
Titanio (Ti) ppm	1
Vanadio (V) ppm	0
Bario (Ba) ppm	1
TAN ASTM D664	
TAN mgKOH/g	IMP
TBN ASTM D 2896	
TBN mgKOH/g	IMP

Fuente. SGS COLOMBIA.

Anexo J.
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ALU TRATADO POR MEDIO DE LA
RÉPLICA DEL EXPERIMENTO AL 50% CON LA CEPA B.

RESULTADO	
Muestra N°	CO110751
Nombre Aceite Lubricante	MOBIL DELVAC MX 15W40
Fecha de toma de muestra	28/09/2018
Equipo (km/h)	0
Aceite (km/h)	0
Relleno (L)	0
Cambio de Aceite (S / N)	N
Aspecto	
Apariencia	OSCURA
Viscosidad ASTM D7279	
Viscosidad 100°C cSt(mm)	IMP
FT-IR (Infra-Red) E 2412	
Oxidación A/0.1 mm	0.37
Nitración A/0.1 mm	0.16
Hollín A/0.1 mm	0.15
Sulfatación A/0.1 mm	0.00
Glicol %	0.00
Agua %	0.52
Fuel %	4.51
Espectrometría ASTM D6595	
Calcio (Ca) ppm	1062
Magnesio (Mg) ppm	684
Molibdeno (Mo) ppm	35
Fósforo (P) ppm	866
Zinc (Zn) ppm	883
Boro (B) ppm	1
Silicio (Si) ppm	32
Sodio (Na) ppm	83
Aluminio (Al) ppm	8
Cromo (Cr) ppm	1
Cobre (Cu) ppm	10
Hierro (Fe) ppm	29
Plomo (Pb) ppm	1
Manganeso (Mn) ppm	1
Níquel (Ni) ppm	1
Plata (Ag) ppm	0
Estaño (Sn) ppm	0
Titanio (Ti) ppm	1
Vanadio (V) ppm	0
Bario (Ba) ppm	0
TAN ASTM D664	
TAN mgKOH/g	IMP
TBN ASTM D 2896	
TBN mgKOH/g	IMP

Fuente. SGS COLOMBIA.

Anexo K.
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ALU TRATADO POR MEDIO DEL
EXPERIMENTO AL 75% CON LA CEPA B.

RESULTADO	
Muestra N°	CO112210
Nombre Aceite Lubricante	MOBIL DELVAC MX 15W40
Fecha de toma de muestra	22/10/2018
Equipo (km/h)	0
Aceite (km/h)	0
Relleno (L)	0
Cambio de Aceite (S / N)	N
Aspecto	
Apariencia	OSCURA
Viscosidad ASTM D7279	
Viscosidad 100°C cSt(mm)	IMP
FT-IR (Infra-Red) E 2412	
Oxidación A/0.1 mm	0.12
Nitración A/0.1 mm	0.10
Hollín A/0.1 mm	0.08
Sulfatación A/0.1 mm	0.00
Glicol %	0.00
Agua %	0.62
Fuel %	2.08
Espectrometría ASTM D6595	
Calcio (Ca) ppm	1165
Magnesio (Mg) ppm	826
Molibdeno (Mo) ppm	43
Fósforo (P) ppm	992
Zinc (Zn) ppm	1072
Boro (B) ppm	0
Silicio (Si) ppm	12
Sodio (Na) ppm	69
Aluminio (Al) ppm	3
Cromo (Cr) ppm	0
Cobre (Cu) ppm	4
Hierro (Fe) ppm	8
Plomo (Pb) ppm	2
Manganeso (Mn) ppm	1
Níquel (Ni) ppm	0
Plata (Ag) ppm	0
Estaño (Sn) ppm	0
Titanio (Ti) ppm	1
Vanadio (V) ppm	0
Bario (Ba) ppm	0
TAN ASTM D664	
TAN mgKOH/g	IMP
TBN ASTM D 2896	
TBN mgKOH/g	10.3

Fuente. SGS COLOMBIA.

Anexo L.
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ALU TRATADO POR MEDIO DE LA
RÉPLICA DEL EXPERIMENTO AL 75% CON LA CEPA B.

RESULTADO	
Muestra N°	CO112211
Nombre Aceite Lubricante	MOBIL DELVAC MX 15W40
Fecha de toma de muestra	22/10/2018
Equipo (km/h)	0
Aceite (km/h)	0
Relleno (L)	0
Cambio de Aceite (S / N)	N
Aspecto	
Apariencia	OSCURA
Viscosidad ASTM D7279	
Viscosidad 100°C cSt(mm)	IMP
FT-IR (Infra-Red) E 2412	
Oxidación A/0.1 mm	0.15
Nitración A/0.1 mm	0.13
Hollín A/0.1 mm	0.09
Sulfatación A/0.1 mm	0.00
Glicol %	0.00
Agua %	0.60
Fuel %	2.22
Espectrometría ASTM D6595	
Calcio (Ca) ppm	1015
Magnesio (Mg) ppm	779
Molibdeno (Mo) ppm	40
Fósforo (P) ppm	975
Zinc (Zn) ppm	1066
Boro (B) ppm	0
Silicio (Si) ppm	12
Sodio (Na) ppm	98
Aluminio (Al) ppm	3
Cromo (Cr) ppm	0
Cobre (Cu) ppm	5
Hierro (Fe) ppm	9
Plomo (Pb) ppm	1
Manganeso (Mn) ppm	1
Níquel (Ni) ppm	0
Plata (Ag) ppm	0
Estaño (Sn) ppm	0
Titanio (Ti) ppm	1
Vanadio (V) ppm	0
Bario (Ba) ppm	0
TAN ASTM D664	
TAN mgKOH/g	IMP
TBN ASTM D 2896	
TBN mgKOH/g	8.9

Fuente. SGS COLOMBIA.

Anexo M.
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ALU TRATADO POR MEDIO DEL
EXPERIMENTO AL 50% CON LA CEPA D.

RESULTADO	
Muestra N°	CO112216
Nombre Aceite Lubricante	MOBIL DELVAC MX 15W40
Fecha de toma de muestra	22/10/2018
Equipo (km/h)	0
Aceite (km/h)	0
Relleno (L)	0
Cambio de Aceite (S / N)	N
Aspecto	
Apariencia	OSCURA
Viscosidad ASTM D7279	
Viscosidad 100°C cSt(m)	5.8
FT-IR (Infra-Red) E 2412	
Oxidación A/0.1 mm	0.61
Nitración A/0.1 mm	0.11
Hollín A/0.1 mm	0.21
Sulfatación A/0.1 mm	0.04
Glicol %	0.00
Agua %	0.00
Fuel %	5.99
Espectrometria ASTM D6595	
Calcio (Ca) ppm	1210
Magnesio (Mg) ppm	537
Molibdeno (Mo) ppm	26
Fósforo (P) ppm	600
Zinc (Zn) ppm	696
Boro (B) ppm	2
Silicio (Si) ppm	22
Sodio (Na) ppm	126
Aluminio (Al) ppm	9
Cromo (Cr) ppm	2
Cobre (Cu) ppm	12
Hierro (Fe) ppm	29
Plomo (Pb) ppm	2
Manganeso (Mn) ppm	1
Níquel (Ni) ppm	1
Plata (Ag) ppm	0
Estaño (Sn) ppm	0
Titanio (Ti) ppm	1
Vanadio (V) ppm	0
Bario (Ba) ppm	1
TAN ASTM D664	
TAN mgKOH/g	1.65

Fuente. SGS COLOMBIA.

Anexo N.
**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ALU TRATADO POR MEDIO DE LA
 RÉPLICA DEL EXPERIMENTO AL 50% CON LA CEPA D.**

RESULTADO	
Muestra N°	CO112217
Nombre Aceite Lubricante	MOBIL DELVAC MX 15W40
Fecha de toma de muestra	22/10/2018
Equipo (km/h)	0
Aceite (km/h)	0
Relleno (L)	0
Cambio de Aceite (S / N)	N
Aspecto	
Apariencia	OSCURA
Viscosidad ASTM D7279	
Viscosidad 100°C cSt(mm)	6.7
FT-IR (Infra-Red) E 2412	
Oxidación A/0.1 mm	0.52
Nitración A/0.1 mm	0.09
Hollín A/0.1 mm	0.17
Sulfatación A/0.1 mm	0.02
Glicol %	0.00
Agua %	0.00
Fuel %	4.83
Espectrometría ASTM D6595	
Calcio (Ca) ppm	1219
Magnesio (Mg) ppm	550
Molibdeno (Mo) ppm	33
Fósforo (P) ppm	636
Zinc (Zn) ppm	719
Boro (B) ppm	2
Silicio (Si) ppm	22
Sodio (Na) ppm	130
Aluminio (Al) ppm	11
Cromo (Cr) ppm	2
Cobre (Cu) ppm	14
Hierro (Fe) ppm	36
Plomo (Pb) ppm	2
Manganeso (Mn) ppm	1
Níquel (Ni) ppm	1
Plata (Ag) ppm	0
Estaño (Sn) ppm	0
Titanio (Ti) ppm	1
Vanadio (V) ppm	0
Bario (Ba) ppm	1
TAN ASTM D664	
TAN mgKOH/g	2.02
TBN ASTM D 2896	
TBN mgKOH/g	5.7

Fuente. SGS COLOMBIA.

Anexo O.
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ALU TRATADO POR MEDIO DEL
EXPERIMENTO AL 75% CON LA CEPA D.

RESULTADO	
Muestra N°	CO112218
Nombre Aceite Lubricante	MOBIL DELVAC MX 15W40
Fecha de toma de muestra	22/10/2018
Equipo (km/h)	0
Aceite (km/h)	0
Relleno (L)	0
Cambio de Aceite (S / N)	N
Aspecto	
Apariencia	OSCURA
Viscosidad ASTM D7279	
Viscosidad 100°C cSt(mr)	IMP
FT-IR (Infra-Red) E 2412	
Oxidación A/0.1 mm	0.27
Nitración A/0.1 mm	0.09
Hollín A/0.1 mm	0.12
Sulfatación A/0.1 mm	0.00
Glicol %	0.00
Agua %	0.22
Fuel %	4.04
Espectrometría ASTM D6595	
Calcio (Ca) ppm	1165
Magnesio (Mg) ppm	721
Molibdeno (Mo) ppm	36
Fósforo (P) ppm	907
Zinc (Zn) ppm	971
Boro (B) ppm	1
Silicio (Si) ppm	10
Sodio (Na) ppm	105
Aluminio (Al) ppm	5
Cromo (Cr) ppm	1
Cobre (Cu) ppm	7
Hierro (Fe) ppm	15
Plomo (Pb) ppm	2
Manganeso (Mn) ppm	1
Níquel (Ni) ppm	0
Plata (Ag) ppm	1
Estaño (Sn) ppm	0
Titanio (Ti) ppm	1
Vanadio (V) ppm	0
Bario (Ba) ppm	1
TAN ASTM D664	
TAN mgKOH/g	IMP
TBN ASTM D 2896	
TBN mgKOH/g	8.7

Fuente. SGS COLOMBIA.

Anexo P.
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ALU TRATADO POR MEDIO DE LA
RÉPLICA DEL EXPERIMENTO AL 75% CON LA CEPA D.

RESULTADO	
Muestra N°	CO112219
Nombre Aceite Lubricante	MOBIL DELVAC MX 15W40
Fecha de toma de muestra	22/10/2018
Equipo (km/h)	0
Aceite (km/h)	0
Relleno (L)	0
Cambio de Aceite (S / N)	N
Aspecto	
Apariencia	OSCURA
Viscosidad ASTM D7279	
Viscosidad 100°C cSt(mr)	IMP
FT-IR (Infra-Red) E 2412	
Oxidación A/0.1 mm	0.25
Nitración A/0.1 mm	0.09
Hollín A/0.1 mm	0.11
Sulfatación A/0.1 mm	0.00
Glicol %	0.00
Agua %	0.20
Fuel %	3.02
Espectrometría ASTM D6595	
Calcio (Ca) ppm	1162
Magnesio (Mg) ppm	688
Molibdeno (Mo) ppm	36
Fósforo (P) ppm	906
Zinc (Zn) ppm	972
Boro (B) ppm	0
Silicio (Si) ppm	9
Sodio (Na) ppm	87
Aluminio (Al) ppm	5
Cromo (Cr) ppm	1
Cobre (Cu) ppm	6
Hierro (Fe) ppm	13
Plomo (Pb) ppm	1
Manganeso (Mn) ppm	1
Níquel (Ni) ppm	0
Plata (Ag) ppm	0
Estaño (Sn) ppm	0
Titanio (Ti) ppm	1
Vanadio (V) ppm	0
Bario (Ba) ppm	1
TAN ASTM D664	
TAN mgKOH/g	IMP
TBN ASTM D 2896	
TBN mgKOH/g	8.6

Fuente. SGS COLOMBIA.

Anexo Q.
SECUENCIA ENSAMBLADA.

5`
CAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGATT
TCAAGGAAGTTTTTCGGATGGAATTGAAATTGACTTAGCGGCGGACGGGTGAG
TAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATAACAGGGGGATAACAGTTGGAAACGGCTG
CTAATACCGCATAAGCACACAGTGCCGCATGGTACGGTGTGAAAACTCCGG
TGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGGTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCA
CCAAGCCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTGGGA
CTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC
AATGGGGGAAACCCTGATCCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCCG
TATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGC
CCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTA
TCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGCACTGCAAGTCTGGAGT
GAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGGACTGCTTTGGAACTGTGGTGCTAGAGT
GCAGGAGAGGTAAGTGAATTCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTA
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAAGTACGTTGAG
GCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGCCGCTA
ACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGGAATGACCGGGATGTAACGAT
CCCTTCCCTTCGGGGCATTGNTAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTA
GTAGCCAGCAAGTCAAGTTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCAGGGATAACCTG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAAGCAAAGGAGCGATCTGGAGCA
AACCCCAAAAATAACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATG
AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAAATGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGGAKTTGGTAACGCCCCAA
RATCAGTGACCCAACCTTAAGGAGGGARCTGCCCAAAGCGGAATGATACTGG
3`

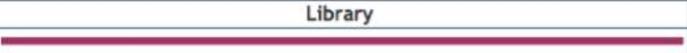
Fuente. CorpoGen.

Anexo R.

RESULTADO DE LA COMPARACIÓN DE SECUENCIAS 16S DE LA CEPA B CONTRA LA BASE DE DATOS RDP, UTILIZANDO LA HERRAMIENTA CLASSIFIER.

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015
Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 16
Query File: classifier_seq_upload8412854331788531308.FASTA
Query Submit Date:

Display depth: **Confidence threshold:** **CopyNumber Adjusted:**

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

rootrank Root (1 sequences) [[show assignment detail for Root only](#)]

- = domain Bacteria (1)
- = » phylum Firmicutes (1)
- = » » class Clostridia (1)
- = » » » order Clostridiales (1)
- = » » » » family Lachnospiraceae (1)
- = » » » » » genus Clostridium XIVa (1)

Fuente. CorpoGen.

Anexo S.

RESULTADO DE LA COMPARACIÓN DE SECUENCIAS 16S DE LA CEPA B, CONTRA SEQMATCH-RDP.

Seqmatch: version 3
 RDP Data: release11_5
 Data Set: both type and non-type strains, isolates, near-full-length sequences (≥ 1200 bases), good quality sequences
 Comments: 307935 sequences were included in the search
 The screening was based on 7-base oligomers

Query Submit Date:

Match hit format: short ID, orientation, similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

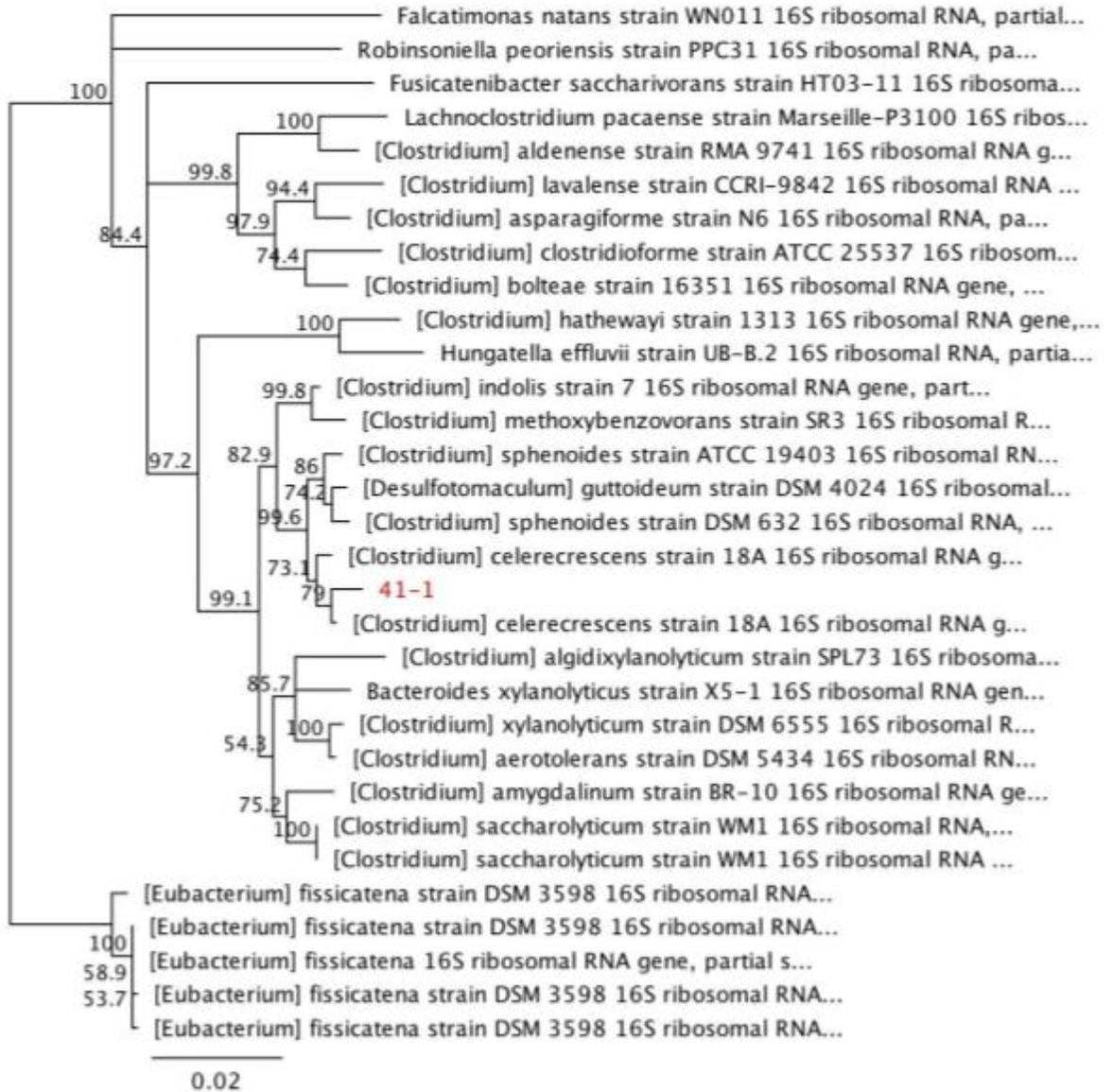
Results for Query Sequence: seqmatch_seq, 1342 unique oligos

```

rootrank Root (20) (match sequences)
  domain Bacteria (20)
    phylum Firmicutes (20)
      class Clostridia (20)
        order Clostridiales (20)
          family Lachnospiraceae (20)
            genus Clostridium XIVa (20)
              S000132837 not_calculated 0.958 1373 Clostridium sp. ArC5; AF443594
              S000331745 not_calculated 0.979 1211 Clostridium celerecrescens; HAW-G4; AY604564
              S000749593 not_calculated 0.977 1285 Clostridium sp. T12; AB277863
              S000749596 not_calculated 0.977 1285 Clostridium sp. U42; AB277866
              S000804478 not_calculated 0.963 1116 Clostridium celerecrescens; DSM 5628; AB294138
              S001294703 not_calculated 0.963 1255 Clostridium celerecrescens; HP2; FM994938
              S002910066 not_calculated 0.961 1405 Desulfotomaculum sp. GY-2; HQ827821
              S002966479 not_calculated 0.970 1217 Desulfotomaculum sp. SAL1_S; JQ271544
              S003281682 not_calculated 0.959 1300 bacterium NLAE-zl-P18; JQ606847
              S003282241 not_calculated 0.965 1301 bacterium NLAE-zl-P144; JQ607406
              S003282250 not_calculated 0.962 1302 bacterium NLAE-zl-P106; JQ607415
              S003282253 not_calculated 0.965 1302 bacterium NLAE-zl-P77; JQ607418
              S003282311 not_calculated 0.960 1313 bacterium NLAE-zl-P668; JQ607476
              S003282334 not_calculated 0.959 1308 bacterium NLAE-zl-P701; JQ607499
              S003282348 not_calculated 0.961 1306 bacterium NLAE-zl-P703; JQ607513
              S003282361 not_calculated 0.957 1308 bacterium NLAE-zl-P705; JQ607526
              S003282367 not_calculated 0.958 1308 bacterium NLAE-zl-P712; JQ607532
              S003754526 not_calculated 0.970 1254 Clostridium sp. BEY9; KC331196
              S004092082 not_calculated 0.963 1359 Desulfotomaculum sp. Gec1-7ana4-1; KJ722506
              S004500059 not_calculated 0.961 1382 [Desulfotomaculum] guttoideum; BU-A43; KT935671
  
```

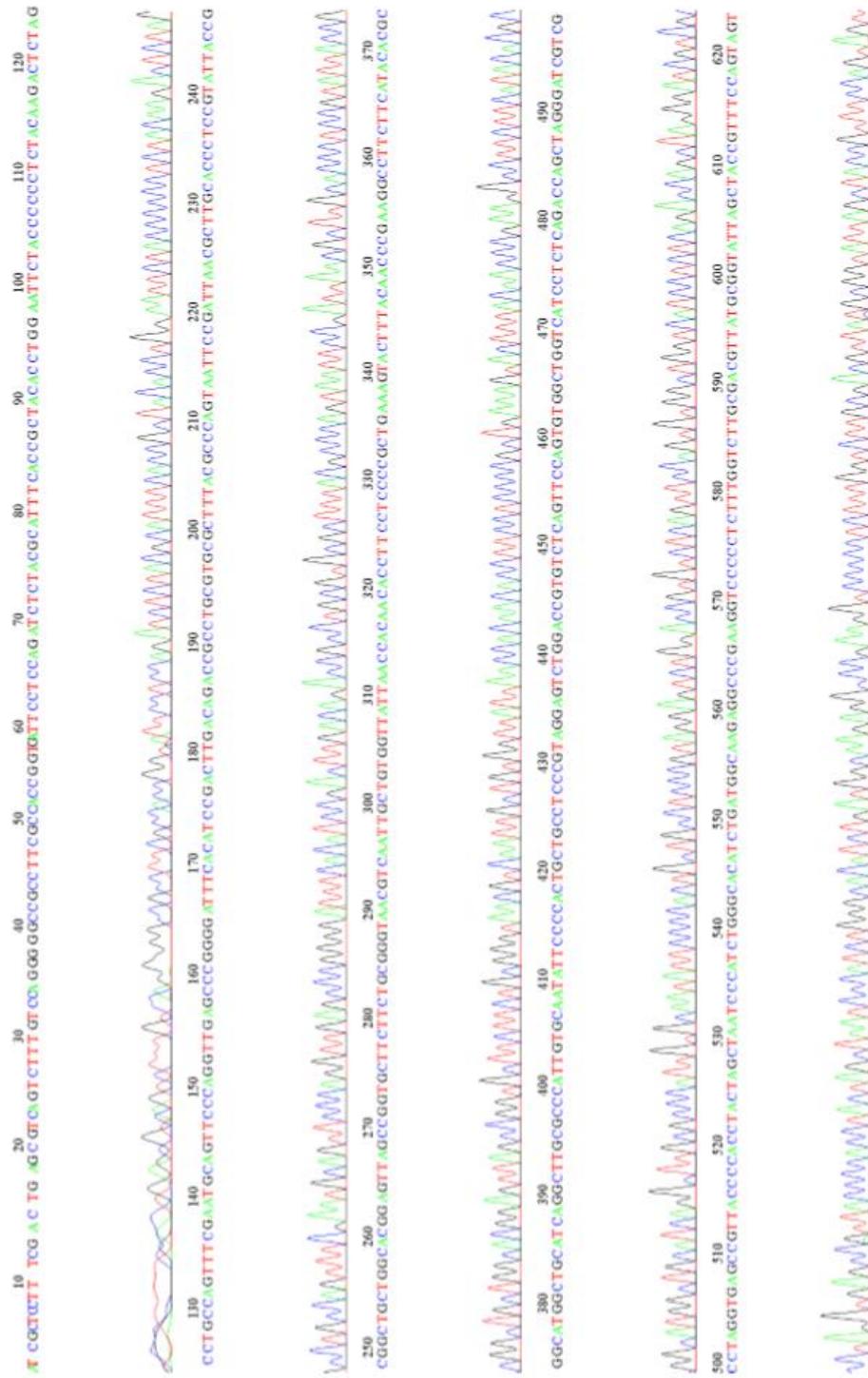
Fuente. CorpoGen.

Anexo T.
ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LA CEPA B.

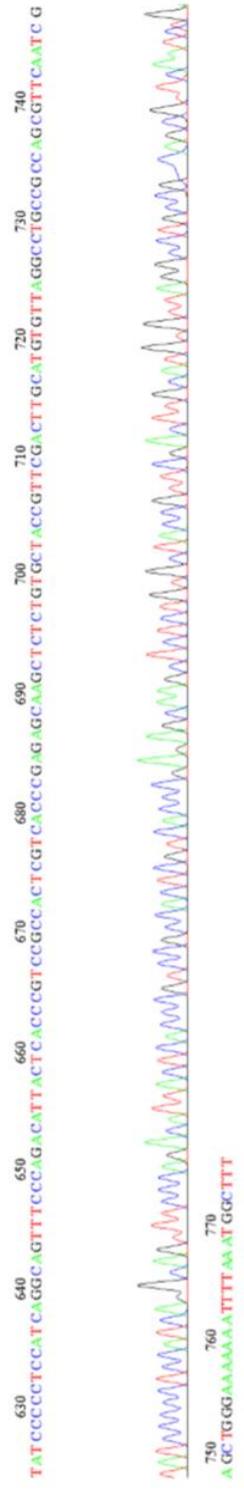


Fuente. CorpoGen.

Anexo U. SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S DE LA CEPA D.



Anexo V. (continuación).



Fuente. CorpoGen.